



INSTITUTO NACIONAL DE  
CIENCIAS MÉDICAS  
Y NUTRICIÓN  
SALVADOR ZUBIRÁN

Ciudad de México a 17 de julio de 2019.

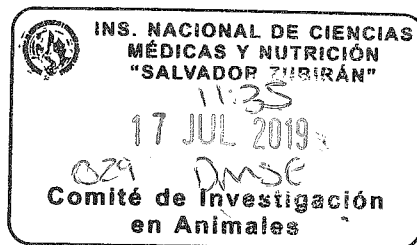
Dr. Jorge Alberto Barrios Payán  
Coordinador del CICUAL  
P r e s e n t e.

Estimado Dr. Barrios:

A continuación le envío constancia del producto derivado del proyecto "Efecto de un portafolio dietario (semilla de chía, nopal deshidratado, aislado de proteína de soya y raíz tumeric longa) en un modelo de OID en ratas Wistar y el impacto en la función cognitiva y la composición de la microbiota".

Atentamente

Dra. Nimbe Torres y Torres  
Investigadora en Ciencias Médicas F  
Depto. Fisiología de la Nutrición



Avenida Vasco de  
Quiroga No. 15  
Colonia Belisario  
Domínguez Sección XVI  
Delegación Tlalpan  
Código Postal 14080  
México, Distrito Federal  
Tel. (52)54870900  
www.incmnsz.mx

To who it may concern

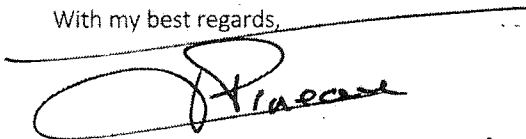
Dear,

With regards to the Master Thesis (i.e. *MSc Sustainable Food Systems*) that Ms Itzel ORTA MÉNDEZ has chosen to develop based on her work within INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN in Mexico I am able to confirm the names of the supervisors contributing to guide and assess the overall outcome and performance :

- PhD Nimbe Torres from Instituto Nacional De Ciencias Médicas Y Nutricion (Mexico) as Master thesis Director
- PhD Per Bendix Jeppesen from University of Aarhus (Denmark) as first supervisor
- Christian Pineau from ISARA Lyon (France) as second supervisor and also head of the Master programme for *MSc Sustainable Food Systems*

They together will form the jury for the Master Thesis oral defense scheduled on next August, 24, 2018

With my best regards,



Christian Pineau  
Directeur du département Agroalimentaire  
Head of MSc SFS programme

**isaralyon**  
Agrapole - 23, rue Jean Baldassini  
F - 69364 LYON cedex 07

**ISARA-Lyon**  
23 rue Jean Baldassini  
69364 LYON CEDEX 07

**Aarhus University**  
Nordre Ringgade 1  
8000 Aarhus

# **Effect of a combination of functional foods on insulin signaling pathway in a diet-induced obesity model**

Master thesis  
**II Cohort (2016-2018)**

Date: *27 August 2018*

**CE**

**Bendix Jeppesen Ph.D. / Aarhus University**  
Dir. of the Agribusiness Department. Christian Pineau / **ISARA-Lyon**  
**Nimbe Torres Ph.D. / National Institute of Medical Science and Nutrition**  
**Salvador Zubirán**



Article

## Differential Effect of Sucrose and Fructose in Combination with a High Fat Diet on Intestinal Microbiota and Kidney Oxidative Stress

Adriana Rosas-Villegas <sup>1</sup>, Mónica Sánchez-Tapia <sup>1</sup>, Azalia Avila-Nava <sup>1</sup>, Victoria Ramírez <sup>2</sup>, Armando R. Tovar <sup>1</sup> and Nimbe Torres <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Fisiología de la Nutrición, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, México D.F. 14080, Mexico; kadriana.rosas@gmail.com (A.R.-V.); qfbmonikt@gmail.com (M.S.-T.); zomi33@gmail.com (A.A.-N.); tovar.ar@gmail.com (A.R.T.)

<sup>2</sup> Departamento de Nefrología, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, México D.F. 14080, Mexico; vikka60@hotmail.com

\* Correspondence: nimbester@gmail.com; Tel./Fax: +52-(55)-5655-3038

Received: 23 February 2017; Accepted: 13 April 2017; Published: 16 April 2017

**Abstract:** There is controversial information about the adverse effect of sucrose (S) or fructose (F) in the development of obesity. Thus, the purpose of the study was to evaluate the effect of S or F in a high fat diet (HF) on gut microbiota and renal oxidative stress. Rats were fed for four months with either high-fat + sucrose (HFS) or high-fat + fructose (HFF) or a control diet (C). Half of the HFS or HFF groups were maintained with the same diet and the other half were switched to the consumption of C. HFS and HFF groups increased 51% and 19% body weight, respectively, compared with the C group. Body fat mass, metabolic inflexibility, glucose intolerance, lipopolysaccharide (LPS), insulin, renal reactive oxygen species (ROS), malondialdehyde (MDA), *Nadphox*, and *Srebp-1* were significantly higher and antioxidant enzymes and lean body mass were significantly lower in the HFS group with respect to the HF-F group. Change in the consumption of HFS or HFF to a C diet ameliorated the insulin and glucose intolerance. The type of carbohydrate differentially modified the microbiota composition, however, both groups significantly decreased *C. eutactus* with respect to the C group. Thus, metabolic alterations with the HFS diet had a more detrimental effect than HFF.

**Keywords:** microbiota; renal oxidative stress; sucrose; fructose; obesity; LPS; inflammation



INSTITUTO NACIONAL DE  
CIENCIAS MÉDICAS  
Y NUTRICIÓN  
SALVADOR ZUBIRÁN

"2019. Año del Caudillo de Sur, Emiliano Zapata"



**ACUSE**

Ciudad de México a 11 de julio de 2019.



**2019**  
AÑO DEL CAUDILLO DEL SUR  
EMILIANO ZAPATA

No. Oficio CICUAL-175-19

**DRA. NIMBE TORRES Y TORRES**  
Departamento de Fisiología de la Nutrición  
Presente.

2500 9:35  
INVEST. EXPERIMENTAL Y  
BIOTERIO  
12 JUL 2019  
DMSE  
INST. NAL. CIENCIAS MEDICAS  
Y NUTRUCIÓN INCMNSZ

Estimada Dra. Torres:

El motivo de este oficio es relacionado a su proyecto con registro CINVA-FNU-1444-15/19-1, intitulado: "EFECTO DE UN PORTAFOLIO DIETARIO (SEMILLA DE CHIA, NOPAL DESHIDRATADO, AISLADO DE PROTEÍNA DE SOYA Y RAIZ TUMERICA LONGA) EN UN MODELO DE OID EN RATAS WISTAR Y EL IMPACTO EN LA FUNCIÓN COGNITIVA Y LA COMPOSICIÓN DE LA MICROBIOTA", con el fin de cumplir con la normatividad de Transparencia e integrar expedientes completos a la plataforma Sistema de Portales de Obligaciones de Transparencia (SIPOT) a la brevedad, le solicitamos la siguiente información:

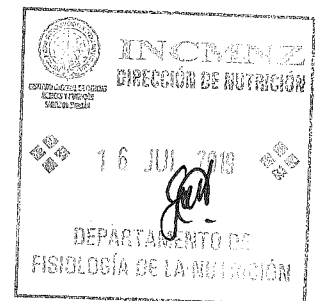
1. Producto derivado del proyecto (tesis de maestría y doctorado)

Le pedimos que nos haga entrega de la información a más tardar 31 de julio de 2019, para reportarlo en los avances del mes de agosto.

Sin más por el momento quedo de usted.

Atentamente,

Dr. Jorge Alberto Barrios Payán  
Coordinador del CICUAL



Avenida Vasco de  
Quiroga No. 15  
Colonia Belisario  
Dominguez Sección XVI  
Delegación Tlalpan  
Código Postal 14080  
Ciudad de México  
Tel. (52-55)54870900  
www.incmnsz.mx

c.c.p. M.V.Z. Mariela Contreras Escamilla, Jefa del DIEB  
JABP/bdr

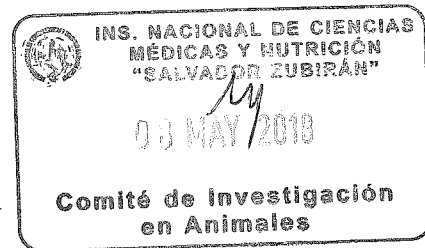


INSTITUTO NACIONAL DE  
CIENCIAS MÉDICAS  
Y NUTRICIÓN  
SALVADOR ZUBIRÁN

México Cd.Mx., a 7 de Mayo del 2018

Dra. Norma Bobadilla Sandoval  
Coordinadora de la CINVA  
Presente

Estimada Dra. Bobadilla:



Por este conducto me permito solicitar el cierre del protocolo: "EFECTO DE UN PORTAFOLIO DIETARIO (SEMILLA DE CHIA, NOPAL DESHIDRATADO, AISLADO DE PROTEINA DE SOYA Y RAIZ TURMERIC LONGA) EN UN MODELO DE OBESIDAD INDUCIDO POR DIETA EN RATAS WISTAR Y EL IMPACTO DE LA FUNCION COGNITIVA Y LA COMPOSICION DE LA MICROBIOTA" con registro CINVA: FNU-1444-15/19-1, debido a que el protocolo ha concluido.

Sin otro particular por el momento, quedo de usted.

Atentamente,

Dra. Nimbe Torres y Torres  
Depto. Fisiología de la Nutrición

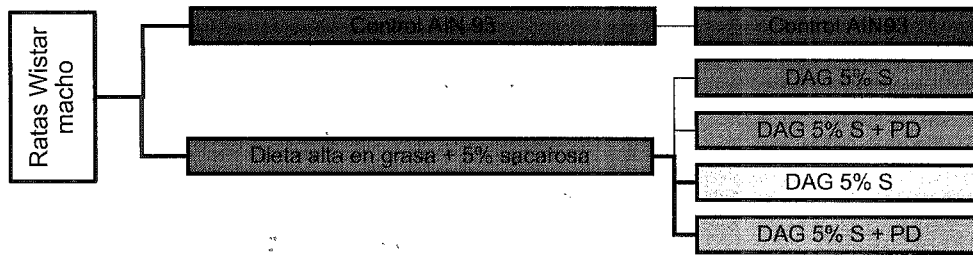


Figura 1. Metodología. Diseño experimental

Al finalizar el periodo de experimentación, los animales fueron sacrificados para la extracción de los órganos de interés. Posterior a la recolección de los tejidos, las muestras se almacenaron en ultracongelación a  $-80^{\circ}\text{C}$  para su conservación. En cuanto a la teoría, la siguiente figura es una representación de los puntos estudiados.

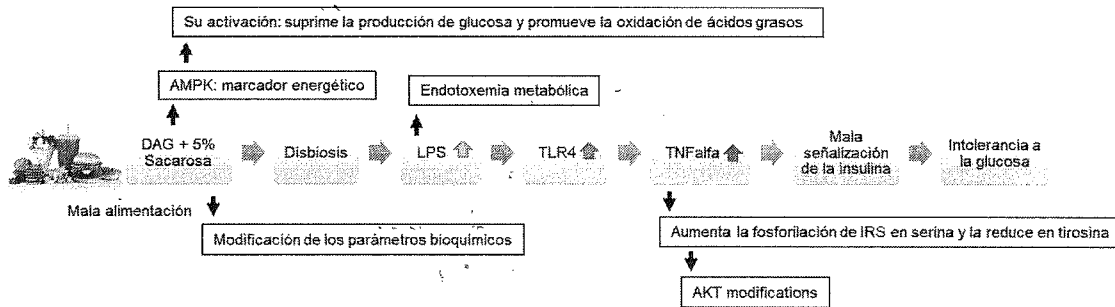


Figura 2. Diagrama de estudio

## Resultados

Se cuantificó la masa corporal a lo largo del periodo experimental. En el gráfico siguiente se observa la curva de crecimiento de los distintos grupos.

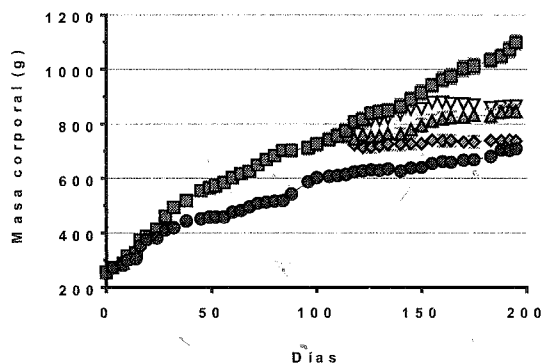


Gráfico 1. Aumento de masa corporal

El grupo experimental con dieta alta en grasa tuvo una masa final cercana a los 1100g. En contraste con el grupo con la dieta control donde su masa final es menor a los 800g. Se aprecia que el grupo que incluyó únicamente los alimentos funcionales (azul) y el grupo que se cambió a la dieta control (amarillo), disminuyeron de peso

Con relación al grupo que tuvo los dos cambios, alimentos funcionales y cambio de dieta (verde), se observa que los animales recuperaron satisfactoriamente su masa corporal. Con el gráfico 2 se corrobora que el efecto de la disminución del sobrepeso se debe a los alimentos funcionales y no a un consumo menor de Kcal. Debido a que no se encontró diferencia entre los consumos registrados.

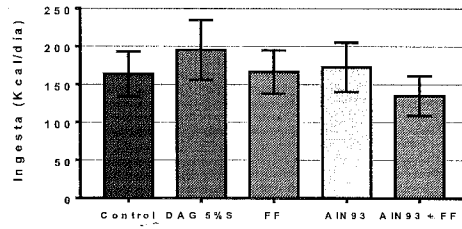


Gráfico 2. Promedio del consumo diario de alimento

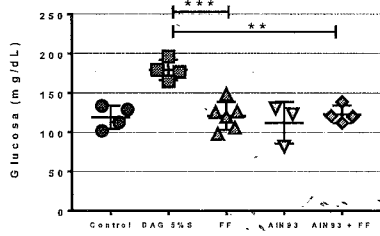


Gráfico 3. Glucosa después del tratamiento

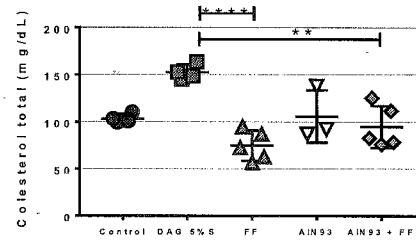


Gráfico 4. Colesterol total después del tratamiento

En cuanto a los parámetros bioquímicos, glucosa y colesterol total, en las dos gráficas anteriores se observa como el tratamiento de los alimentos funcionales revierten el efecto de la dieta alta en grasa y azúcar. La misma tendencia se observa en la medición de insulina en suero y en la curva de tolerancia a la glucosa (Gráficos 5 y 6).

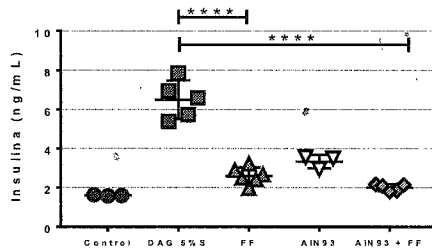


Gráfico 5. Insulina en suero después del tratamiento

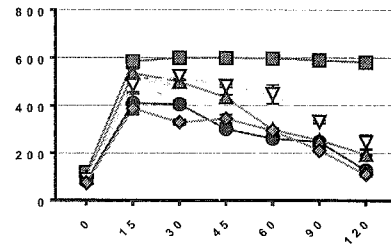


Gráfico 6. Curva de tolerancia a la glucosa de los grupos

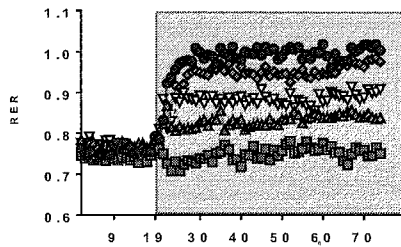


Gráfico 7. Medición de la flexibilidad metabólica a través del recambio de respiración

La flexibilidad metabólica es la capacidad de cambiar de sustratos y obtener energía de hidratos de carbono o de ácidos grasos. Cuando esta capacidad se pierde por el consumo de una dieta alta en grasa, se dice que hay una inflexibilidad metabólica. Se observa en el gráfico 7, como el grupo que consumió la dieta alta en grasa perdió la capacidad de cambiar de sustrato. En contraste con el grupo que consumió el portafolio dietario junto con la dieta control, vemos que los animales recuperaron la habilidad de obtener energía de ambos sustratos



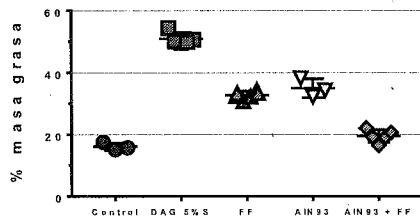


Gráfico 8. Porcentaje de masa grasa

La composición corporal del grupo control tiene un porcentaje de grasa menor al 20%, en contraste del grupo que consumió la dieta alta en grasa que se encuentra alrededor del 50%. En cuanto a los grupos con alimentos funcionales se observa el efecto mayormente en el grupo de animales que ingirieron los alimentos funcionales y dieta control.

En la gráfica 9 está representada la concentración de lipopolisacárido en suero. Las altas concentraciones están relacionadas con endotexemia metabólica que se ve reflejada en marcadores de inflamación como son los *toll like receptors* (TLR). En el gráfico 10 se aprecia el marcador de inflamación TLR4 que está directamente relacionado con el LPS.

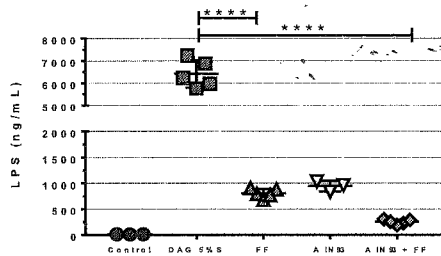


Gráfico 9. Concentración de lipopolisacárido en suero

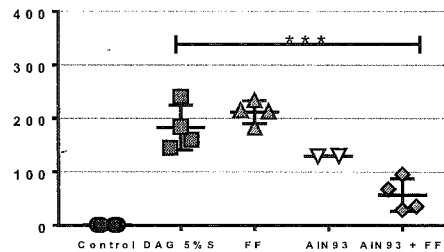


Gráfico 10. Expresión relativa de TLR4

En relación con la microbiota intestinal, el mayor cambio se puede apreciar en la proporción de *bacteroidetes* y *firmicutes*. Se ha relacionado positivamente el dominio de *bacteroidetes* sobre *firmicutes*, pues éstos son más abundantes en sujetos con obesidad. Mientras que *bacteroidetes*, especialmente *Bacteroides fragilis*, son necesarios en la omisión de proinflamatorios.

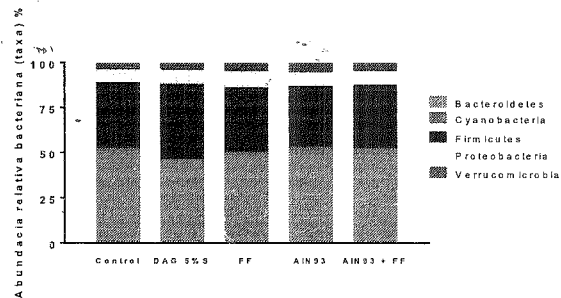


Gráfico 11. Abundancia relativa bacteriana al nivel de phylum

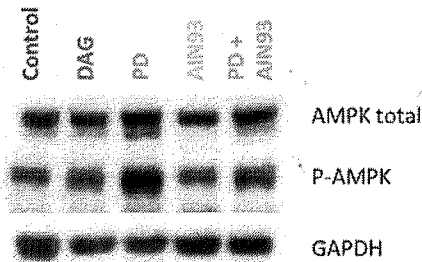


Figura 3. Western Blot de AMPK, pAMPK y GAPDH en músculo

AMPK (*AMP-activated protein kinase*) es un marcador de energía que tiene un papel esencial en el balance energético de la célula y el consumo de calorías. La activación de esta proteína suprime la producción de glucosa y promueve la oxidación de ácidos grasos. Se aprecia que en los grupos consumidores de alimentos funcionales se encuentra más expresadas las proteínas que resto de los grupos (Figura 3 y Gráfico 12).

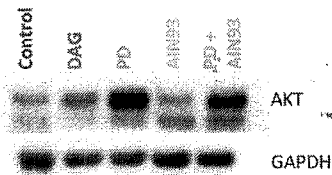


Figura 4. Western Blot de AKT total en músculo



Gráfico 12. Densitometría de AKT total normalizado

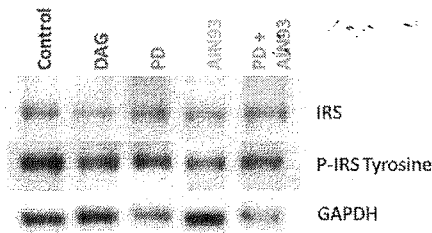


Figura 5. Western Blot de IRS, pIRS (tirosina) y GÁRDH

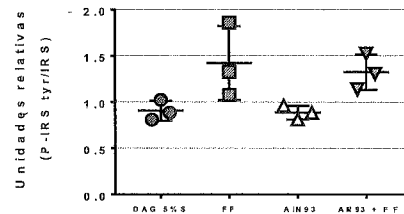


Gráfico 13. Densitometría de pIRS/IRS normalizado

En la Figura 4 y Gráfico 12 está representada la expresión de AKT total (*Protein kinase B*). AKT se ve modificada por el aumento o disminución de la fosforilación de IRS (*Insulin receptor substrate*). En las dos últimas figuras se observa que la fosforilación positiva en tirosina de IRS es mayor en los grupos de alimentos funcionales con dieta alta en grasa o dieta control. Esto indica que la señalización de la vía de la insulina se ve restaurada con el consumo de los alimentos funcionales. En conjunto, los análisis realizados respaldan la hipótesis de que el consumo de la combinación de alimentos funcionales mejorará la señalización de la vía de la insulina en ratas obesas.

## Bibliografía

- Baothman, O. A., Zamzami, M. A., Taher, I., Abubaker, J., & Abu-Farha, M. (2016). The role of Gut Microbiota in the development of obesity and Diabetes. *Lipids in Health and Disease*, 15(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/s12944-016-0278-4>
- Boulangé, C. L., Neves, A. L., Chilloux, J., Nicholson, J. K., & Dumas, M. E. (2016). Impact of the gut microbiota on inflammation, obesity, and metabolic disease. *Genome Medicine*, 8(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s13073-016-0303-2>
- Cani, P. D., Amar, J., Iglesias, M. A., Poggi, M., Knauf, C., Bastelica, D., ... Alessi, M. C. (2007). Metabolic Endotoxemia Initiates Obesity and Insulin Resistance. *Diabetes*, 56(July), 1761–1772. <https://doi.org/10.2337/db06-1491>.P.D.C.
- Cani, P. D., Osto, M., Geurts, L., & Everard, A. (2012). Involvement of gut microbiota in the development of low-grade inflammation and type 2 diabetes associated with obesity. *Gut Microbes*, 3(4), 279–288.

<https://doi.org/10.4161/gmic.19625>

- Collins, K. H., Paul, H. A., Hart, D. A., Reimer, R. A., Smith, I. C., Rios, J. L., ... Herzog, W. (2016). A High-Fat High-Sucrose Diet Rapidly Alters Muscle Integrity, Inflammation and Gut Microbiota in Male Rats. *Scientific Reports*, 6(June), 1–10. <https://doi.org/10.1038/srep37278>
- López-Romero, P., Pichardo-Ontiveros, E., Avila-Nava, A., Vázquez-Manjarrez, N., Tovar, A. R., Pedraza-Chaverri, J., & Torres, N. (2014). The Effect of Nopal (*Opuntia Ficus Indica*) on Postprandial Blood Glucose, Incretins, and Antioxidant Activity in Mexican Patients with Type 2 Diabetes after Consumption of Two Different Composition Breakfasts. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*, 114(11), 1811–1818. <https://doi.org/10.1016/j.jand.2014.06.352>
- Medina-Torres, L., Vernon-Carter, E. J., Gallegos-Infante, J. A., Rocha-Guzman, N. E., Herrera-Valencia, E. E., Calderas, F., & Jiménez-Alvarado, R. (2011). Study of the antioxidant properties of extracts obtained from nopal cactus (*Opuntia ficus-indica*) cladodes after convective drying. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91(6), 1001–1005. <https://doi.org/10.1002/jsfa.4271>
- Moran-Ramos, S., Avila-Nava, A., Tovar, A. R., Pedraza-Chaverri, J., Lopez-Romero, P., & Torres, N. (2012). *Opuntia ficus indica* (Nopal) Attenuates Hepatic Steatosis and Oxidative Stress in Obese Zucker (fa/fa) Rats. *Journal of Nutrition*, 142(11), 1956–1963. <https://doi.org/10.3945/jn.112.165563>
- Muñoz, L. A., Cobos, A., Díaz, O., & Aguilera, J. M. (2013). Chia Seed (*Salvia hispanica*): An Ancient Grain and a New Functional Food. *Food Reviews International*, 29(4), 394–408. <https://doi.org/10.1080/87559129.2013.818014>
- Sánchez-Tapia, M., Aguilar-López, M., Pérez-Cruz, C., Pichardo-Ontiveros, E., Wang, M., Donovan, S. M., ... Torres, N. (2017). Nopal (*Opuntia ficus indica*) protects from metabolic endotoxemia by modifying gut microbiota in obese rats fed high fat/sucrose diet. *Scientific Reports*, 7(1), 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05096-4>

Durante este Proyecto publicamos el siguiente artículo



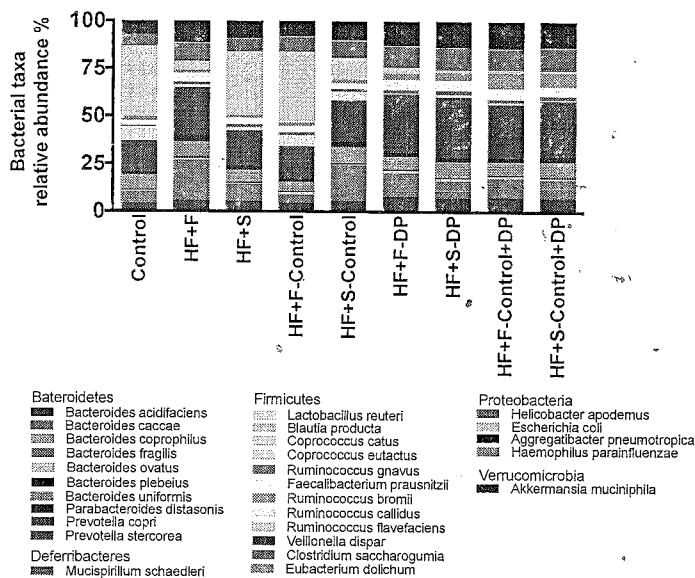
INSTITUTO NACIONAL DE  
CIENCIAS MÉDICAS  
Y NUTRICIÓN  
SALVADOR ZUBIRÁN

Ciudad de México a 4 de Mayo de 2018

## INFORME FINAL

### EFFECTO DE UN PORTAFOLIO DIETARIO (SEMILLA DE CHIA, NOPAL DESHIDRATADO, AISLADO DE PROTEINA DE SOYA Y RAIZ TUMERICA LONGA) EN UN MODELO DE OID EN RATAS WISTAR Y EL IMPACTO EN LA FUNCION COGNITIVA Y LA COMPOSICION DE LA MICROBIOTA.

Este protocolo ya se terminó, estamos en el proceso de analizar varios genes. Ya se terminó de analizar la microbiota intestinal.



Con este proyecto se espera titular a 2 estudiantes, uno de maestría (Itzel Orta) y otro de doctorado (Syed Tauqeerunnisa Begum) en este año.

Atentamente,

*Nimbe Torres y Torres*  
Dra Nimbe Torres y Torres  
Investigadora responsable  
Depto de Fisiología de la Nutrición

Avenida Vasco de  
Quiroga No. 15  
Colonia Belisario  
Dominguez Sección XVI  
Delegación Tlalpan  
Código Postal 14080  
México, Distrito Federal  
Tel. (52) 54870900  
www.incmnsz.mx

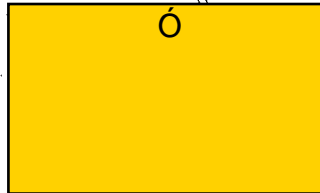


INSTITUTO NACIONAL DE  
CIENCIAS MÉDICAS  
Y NUTRICIÓN  
SALVADOR ZUBIRÁN

México Cd., Mx a 26 de abril de 2018.

No. Oficio CINVA 066-18

Dra. Nimbe Torres y Torres  
Depto. Fisiología de la Nutrición  
Presente.



Estimada Dra. Torres.:

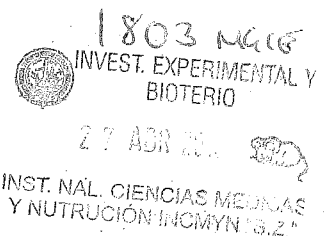
Por este conducto le informo que su proyecto con título "EFECTO DE UN PORTAFOLIO DIETARIO (SEMILLA DE CHÍA, NOPAL DESHIDRATADO, AISLADO DE PROTEÍNA DE SOYA, Y RAÍZ TURMÉRICA LONGA) EN UN MODELO DE OBESIDAD INDUCIDO POR DIETA EN RATAS WISTAR Y EL IMPACTO EN LA FUNCIÓN COGNITIVA Y LA COMPOSICIÓN DE LA MICROBIOTA", con registró CINVA FNU-1444-15/19-1 finalizó en marzo 2018. Por lo que le solicito de la manera más atenta me haga saber si el proyecto requerirá una prórroga. En caso afirmativo, favor de enviar a la CINVA el periodo de extensión que solicita y de requerir un mayor número de animales especificar y justificar como se utilizarán y los procedimientos experimentales que se llevarán a cabo con los mismos. En caso de no requerir una prórroga favor de llenar el formato de cierre del proyecto que se anexa a la presente (en hoja membretada e impresa) y adjunte los siguientes documentos indispensables para la conclusión del proyecto:

1. Informe final
2. Productos de Investigación derivados del proyecto (artículos, tesis, libros, capítulos de libro, patentes, presentaciones en congreso, entre otros).

Sin más por el momento quedo de usted.

Atentamente,

Dra. Norma A. Bobadilla Sandoval  
Coordinadora de la Comisión de Investigación en Animales



c.c.p. M.V.Z. Mariela Contreras Escamilla, Jefa del DIEB

NABS/nom

Avenida Vasco de  
Quiroga No. 15  
Colonia Belisario  
Domínguez Sección XVI  
Delegación Tlalpan  
Código Postal 14080  
México, Distrito Federal  
Tel. (52)54870900  
www.incmnsz.mx



INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN



*Acuse*

"2015, Año del Generalísimo José María Morelos y Pavón"

México, D. F., a 12 de Marzo del 2015.

DRA. NIMBE TORRES Y TORRES  
Depto. de Fisiología de la Nutrición  
Presente

REF: CINVA 1444, CLAVE FNU-1444-15/19-1

Estimada Dra. Torres:

Habiendo analizado detalladamente el Protocolo de Investigación Experimental titulado:

**"EFECTO DE UN PORTAFOLIO DIETARIO (SEMILLA DE CHÍA, NOPAL DESHIDRATADO, AISLADO DE PROTEÍNA DE SOYA, Y RAÍZ TURMÉRICA LONGA) EN UN MODELO DE OBESIDAD INDUCIDO POR DIETA EN RATAS WISTAR Y EL IMPACTO EN LA FUNCIÓN COGNITIVA Y LA COMPOSICIÓN DE LA MICROBIOTA INTESTINAL."**

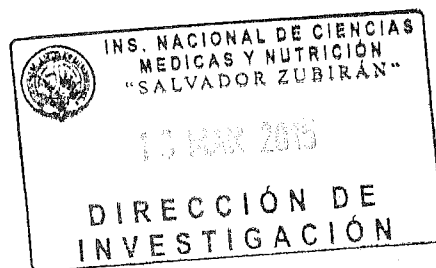
Este comité ha dictaminado **aprobarlo** a partir de esta fecha.

Sin más por el momento quedo de usted.

Atentamente,

Dra. Norma A. Bobadilla Sandoval  
Coordinadora de la Comisión de Investigación en Animales

c.c.p. Dr. Gerardo Gamba Ayala, Director de Investigación  
M.V.Z. Mariela Contreras Escamilla, Jefa del DIEB



Vasco de Quiroga No. 15  
Colonia Sección XVI  
Delegación Tlalpan  
México, D. F. 14000  
Tel. (52)54870900  
www.incmnsz.mx

INCMNSZ  
DIRECCIÓN DE NUTRICIÓN

17 MAR 2015  
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGIA DE LA NUTRICIÓN



INSTITUTO NACIONAL DE  
CIENCIAS MÉDICAS  
Y NUTRICIÓN  
SALVADOR ZUBIRÁN

México, D.F., a 27 de Enero del 2015

Dra. Norma A. Bobadilla Sandoval

Coordinadora de la Comisión de Investigación en Animales

Presente.

REF: CINVA 1444, Clave: FNU-1444-15/19-1

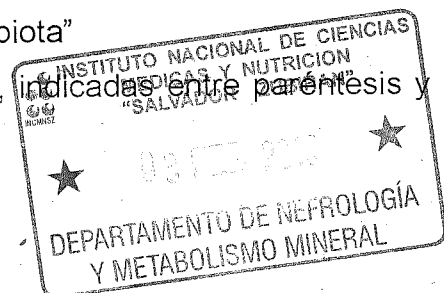
Estimada Dra. Bobadilla

Por medio de la presente aclaro las observaciones realizadas por el comité al Protocolo de Investigación Experimental Títulado

“Efecto de un portafolio dietario (semilla de chíá, nopal deshidratado, aislado de proteína de soya, y raíz turmérica longa) en un modelo de obesidad inducido por dieta en ratas Wistar y el impacto en la función cognitiva y la composición de la microbiota”.

1. El título del proyecto incluirá la palabra macho y quedara como sigue “Efecto de un portafolio dietario (semilla de chíá, nopal deshidratado, aislado de proteína de soya, y raíz turmérica longa) en un modelo de obesidad inducido por dieta en ratas Wistar macho y el impacto en la función cognitiva y la composición de la microbiota”
2. Los antecedentes si cuentan con referencias, indicadas entre paréntesis y

Vasco de Quiroga No. 15 la bibliografía esta al final del documento  
Colonia Sección XVI  
Delegación Tlalpan  
México, D. F. 14000  
Tel. (52)54870900  
www.incmnsz.mx





**INSTITUTO NACIONAL DE  
CIENCIAS MÉDICAS  
Y NUTRICIÓN  
SALVADOR ZUBIRÁN**

3. La figura se anexo como archivo adjunto ya que el sistema latis no permite el anexo de figuras dentro del texto
4. Se eliminaron los antecedentes repetidos
5. Se anexo en los antecedentes una sección donde se explica el papel de la microbiota en la obesidad y desarrollo de daño cognitivo
6. Se incluyo la metodología para medir la microbiota. NO es necesario el aislamiento de los animales ya que no son animales libres de patógenos. El animal no sufrirá de ningun estrés ya que se recolectan las heces frescas en el momento que se pesa al animal.
7. Se completo la hipotesis y quedo de la siguiente manera: La hipótesis planteada en el proyecto es que el uso una combinación de distintos alimentos funcionales (semilla de chíá, nopal deshidratado, aislado de proteína de soya, y raíz turmericá longa) en animales con obesidad inducida por dieta. Debido a la presencia de fibra soluble e insoluble, flavonoides, fitoesteroles, polifenoles,  $\beta$ -carotenos, acidos grasos omega 3, antioxidantes, proteína vegetal en el portafolio dietario, su consumo tendrá un efecto en la disminución de firmicutes y un incremento en bacteriodetes, además de mostrar una mejora en parámetros bioquímicos asociados a obesidad, así como un efecto neuroprotector en ratas obesas, debido a la disminución del estrés oxidativo en el cerebro
8. Se completaron de una manera breve los métodos describiendo que se hará en cerebro e hígado.
9. El consumo del portafolio dietario será de 3 meses
10. Las pruebas conductuales se harán en periodo de luz





**INSTITUTO NACIONAL DE  
CIENCIAS MÉDICAS  
Y NUTRICIÓN  
SALVADOR ZUBIRÁN**

11. Se amplió la descripción de la habituación en la prueba de reconocimiento de los objetos.
12. Se cuantificara en hígado factores transcripcionales asociados a metabolismo de lípidos, inflamación y estrés en el retículo endoplásmico. Mientras que en cerebro se determinarían factores transcripcionales de inflamación y estrés oxidativo. Se añadió una columna a la tabla donde indica donde se llevara a cabo la medición de cada gen.
13. Las muestras sanguíneas de la curva de tolerancia a la glucosa se tomarán de la cola al final del periodo de inducción a la obesidad y las muestras de sangre del seno retroocular se tomarán una semana después de las pruebas conductuales por 1 sola vez. Se añadió esto en la sección de metodología.
14. Los animales no sufriran de angustia, incomodidad o dolor significativo e inevitable para ser considerado categoría D.
15. La toma de muestra sanguínea para determinación de perfil lipídico y glucosa, se realizarán bajo anestesia (SEVORANE). El día del sacrificio la toma de muestra sanguínea también se hará bajo anestesia (SEVORANE) por punción cardíaca.
16. Se puso esa duración del proyecto por si hubiera la necesidad de repetir o retrasar el protocolo y evitar hacer una extensión del proyecto o prorroga.
17. En la siguiente tabla se muestra la composición porcentual de las dietas.



INSTITUTO NACIONAL DE  
CIENCIAS MÉDICAS  
Y NUTRICIÓN  
SALVADOR ZUBIRÁN

Dieta	AIN-93	DAGS+S	PD
Ingrediente	%	%	%
Almidón	39.749	23.903	37.938
Caseína	20	24	-
Maltodextrina	13.2	10.267	13.2
Sacarosa	10	7.778	10
Aceite de soya	7	7	-
Celulosa	5	2.5	-
Mineral mix	3.5	3.5	3.5
Vitaminas mix	1	1	1
L-Cistina	0.3	0.3	0.3
Colina	0.25	0.25	0.25
TBHQ	0.0014	0.0014	-0.014
Inulina	-	2.5	-
Manteca	-	17	-
Nopal	-	-	5
Soya	-	-	20
Chía	-	-	7
Curcuma	-	-	0.0042

18. Sería conveniente para el estudio que se corrieran todos los grupos en un solo lote para evitar variaciones o cambios drásticos en la temperatura. Para el día del sacrificio se podría hacer escalonadamente. Estos cambios se incluyeron en protocolo.
19. La prueba de tolerancia a la glucosa no es ORAL, es intraperitoneal y se describe en lo métodos como se realizará los animales no serán anestesiados y estarán en ayuno de toda la noche
20. El ayuno será de toda la noche y se incluye en la metodología.



INSTITUTO NACIONAL DE  
CIENCIAS MÉDICAS  
Y NUTRICIÓN  
SALVADOR ZUBIRÁN

21. El sacrificio se llevará a cabo por asfixia debido al tamaño de los animales como lo sugiere el comité.
22. El cálculo de la ingesta calórica se realizará mediante la medición del consumo de alimento y el azúcar en el agua tomando en cuenta las calorías que aporta cada nutrimento.
23. La calorimetria se llevará cabo de acuerdo a lo previamente publicado, se añadio la referencia.
24. Los animales serán alimentados por un periodo de 7 meses con una dieta alta en grasa saturada y azúcar en el agua o dieta control y después de este tiempo se les cambiará a una dieta específica como se indica en la metodología (pag 7 y 8).
25. Las dietas se prepararán en la planta piloto del Depto de Tecnologia de los Alimentos. Esto se incluyo en la metodología.
26. El tamaño de la muestra es igual en todos los grupos (n=6). Esto esta especificado en la metodología.

Atentamente,

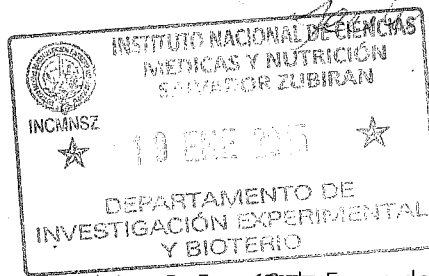
Dra Nimbe Torres y Torres

Investigadora en Ciencias Médicas F

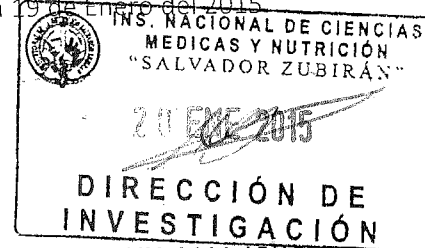


INSTITUTO NACIONAL DE  
CIENCIAS MÉDICAS  
Y NUTRICIÓN  
SALVADOR ZUBIRÁN

Recibi  
Laura Zavala R  
Enero 19, 2015



México, D. F., a 19 de Enero del 2015.



Dra. Nimbe Torres y Torres  
Depto. de Fisiología de la Nutrición  
Presente.

REF: CINVA 1444, Clave: FNU-1444-15719-1

Estimada Dra. Torres:

Habiendo analizado detalladamente el Protocolo de Investigación Experimental titulado:

**“Efecto de un portafolio dietario (semilla de chía, nopal deshidratado, aislado de proteína de soya, y raíz turmerica longa) en un modelo de obesidad inducido por dieta en ratas Wistar y el impacto en la función cognitiva y la composición de la microbiota.”**

Este comité ha dictaminado dejar **Pendiente**, la aprobación hasta que se aclaren las siguientes observaciones:

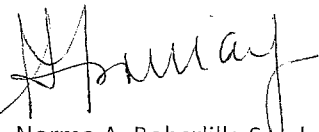
1. Se recomienda agregar en el título que el proyecto se realizará en ratas Wistar macho.
2. Los antecedentes son adecuados, sin embargo, el texto carece de referencias.
3. En la página 2 existe un pie de figura, pero no se anexó la figura.
4. Algunos conceptos en los antecedentes están repetidos (inclusive con un tipo de letra y tamaño diferente).
5. En los antecedentes el tema de la microbiota apenas y lo mencionan, pero se encuentra incluida en la hipótesis y objetivos. Se recomienda incluir en los antecedentes la relación entre microbiota y actividad cognitiva, o eliminar esta parte del estudio.
6. En cuanto a la microbiota, se plantea como objetivo, pero no se describe en los métodos cómo se realizará. Esta parte es complicada, ya que no solo se obtienen las heces, sino que se deben aislar a los animales y esto no es aclarado, ni como será la manipulación.
7. La hipótesis es muy escueta con respecto al efecto neuroprotector (ejemplo decir si se atribuye a la plasticidad del hipocampo, o disminución del daño oxidante, etc).
8. En los métodos se aclara que se recolectará tejido para estudios histológicos, pero no se describe qué harán específicamente en el cerebro y en el hígado.
9. En uno de los documentos se especifica que el consumo del portafolio dietario será 3 meses después de 7 meses de inducir la obesidad, y en el otro dice que será 2 meses. Favor de unificar la información proporcionada.
10. Para las pruebas conductuales no se aclara si se hará en el periodo luz u oscuridad.
11. Es conveniente que especifiquen el tiempo de habituación en la prueba de reconocimiento de los objetos.
12. De los factores transcripcionales a cuantificar, no se especifica si será en hígado o cerebro o ambos.

13. Con respecto a la curva de tolerancia a la glucosa, se menciona que se tomarán las muestras de la cola, pero en el formato de apoyo dice que se tomará del seno retroocular. De ser así, esto interferiría con las pruebas conductuales porque el animal deja de ver bien.
14. La categoría de invasividad del estudio fue determinada como B, sin embargo, por el nivel de invasividad el protocolo esta comisión considera como nivel D.
15. La administración del anestésico se especifica para una sola ocasión, sin embargo es recomendable especificar como será e cada toma de las muestra de sangre además del día del sacrificio.
16. Vigencia del protocolo: en la propuesta se indica 3 años, sin embargo únicamente describen experimentos correspondientes a un año.
17. Sería recomendable que detallaran la dieta a utilizar y no únicamente especificar los ingredientes de la dieta portafolio.
18. Se recomienda que el protocolo sea desfasado.
19. Favor de especificar el procedimiento de la prueba de tolerancia oral a la glucosa. De dónde si los animales serán anestesiados y si estarán en ayuno, así como el tiempo del mismo.
20. Especificar los tiempos de ayuno para curva de tolerancia a la glucosa y para el sacrificio.
21. Debido a que los animales tendrán un peso superior a los 600grs se recomienda que el sacrificio no se haga por dislocación sino por asfixia con CO<sub>2</sub>
22. No se especifica el procedimiento para calcular la ingesta calórica
23. Describir el procedimiento para la calorimetría indirecta.
24. No queda claro, si la dieta empleada durante los primeros 7 meses continúa en forma suplementada por 2 meses más o si será cambiada a una dieta normal.
25. Especificar si las dietas se prepararan o se comprarán preparadas.
26. No se justifica el tamaño de muestra (n=6) en el grupo A, (n=2) en los subgrupos del grupo B y (n=4) en los subgrupos del grupo C.

Es importante señalar que las correcciones deben hacerse en el Sistema de Latis y enviar la respuesta a cada punto solicitado, tanto en forma impresa como, por correo electrónico.

Sin más por el momento quedo de usted.

Atentamente,



Dra. Norma A. Bobadilla Sandoval  
Coordinadora de la Comisión de Investigación en Animales

c.c.p. Dr. Gerardo Gamba, Director de Investigación  
Dra. Ma. Elena Flores, Encargada del Bioterio

NAB/nom

<p><small>No se podrá escanear la imagen simulada. Revise que se haya escaneado, modificado la escritura o eliminado el ambiente. Compruebe que el tamaño real de la imagen de escaneo sea el mismo que el original.</small></p>	<p><b>INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN</b></p> <p><b>SALVADOR ZUBIRAN</b></p> <p><b>Dirección de Investigación</b></p> <p><b>FORMA ÚNICA PARA REGISTRO DE PROYECTOS</b></p>
--	---

**FECHA DE RECEPCIÓN:** 28/11/2014 **CLAVE:** FNU-1444-15/19-1

**TÍTULO:** Efecto de un portafolio dietario (semilla de chía, nopal deshidratado, aislado de proteína de soya, y raíz turmerica longa) en un modelo de obesidad inducido por dieta en ratas Wistar y el impacto en la función cognitiva y la composición de la microbiota

**INVESTIGADOR RESPONSABLE:** TORRES Y TORRES NIMBE

**DEPARTAMENTO O SERVICIO:** DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGIA DE LA NUTRICIÓN

**TIPO DE INVESTIGACIÓN:** INVESTIGACIÓN EXPERIMENTAL

**PATROCINADORES:**

Patrocinador	Cantidad

**VIGENCIA DEL PROYECTO:** Del 19/01/2015 al 12/01/2018

Trimestre 1      Trimestre 2      Trimestre 3      Trimestre 4

COSTO TOTALES DE LA INVESTIGACIÓN	INSTITUCIONES PARTICIPANTES	
Personal	\$ 0.00	
(sueldos y sobresueldos al personal)		
Equipos	\$ 0.00	
(de laboratorio, cómputo, transporte, etc.)		
Materiales	\$ 0.00	
(reactivos, consumibles, desechables, etc.)		
Animales	\$ 0.00	
(adquisición, cuidado, procedimientos, etc.)		
Estudios	\$ 0.00	
(de laboratorio, gabinete, especiales, etc.)		
Viaticos	\$ 0.00	
(reuniones científicas y trabajo de campo)		
Publicaciones	\$ 0.00	
costo directos de publicación, sobregiro)		
		FIRMAS
		<div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;"> <p>Investigador responsable</p> </div> <div style="text-align: center;"> <p>Jefe de Departamento</p> </div> </div>
		<div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="width: 45%;">Comité de Investigación en Humanos</div> <div style="width: 45%;">Comite de Investigación en Animales</div> </div>
		<div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="width: 45%;">Director de Investigación</div> <div style="width: 45%;">Director General</div> </div>
		Fecha de resolución

Suscripciones	\$ 0.00
libros, revistas, software, periódicos, etc)	
Varios	\$ 0.00
(teléfono, fax, fotocopias, mensajería, etc)	
Admon. Gastos pacientes	\$ 0.00
Fondo de apoyo	\$ 0.00
15% de la cantidad total del proyecto	
Total :	\$ 0.00

Recibi  
 Setieia  
 9/12/14



**FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.**

No. CINVA:

CLAVE: FNU-1444-15/19-1

Fecha de registro del Protocolo: 28-nov-14

**Título del Protocolo:** "Efecto de un portafolio dietario (semilla de chía, nopal deshidratado, aislado de proteína de soya, y raíz turmérica longa) en un modelo de obesidad inducido por dieta en ratas Wistar y el impacto en la función cognitiva y la composición de la microbiota"

**Propuesta:** a) Nueva b) Renovación

<b>Investigador Responsable del Proyecto.</b>	
Nombre del Investigador Titular	Dra. Nimbe Torres Torres
Institución de Adscripción	Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán"
Departamento de Adscripción	Fisiología de la Nutrición
Teléfono	0 [REDACTED]
Correo electrónico	0 [REDACTED]

<b>Investigadores que Participaran en el Protocolo</b>			
Nombre	Grado	Teléfono	e-mail
Claudia Pérez Cruz	Doctora	57473800 ext 5442	cperezc@cinvestav.mx
Armando Roberto Tovar Palacio	Doctor	0 [REDACTED]	0 [REDACTED]

<b>Estudiantes</b>			
Nombre	Grado a obtener	Teléfono	e-mail
0E [REDACTED]	Maestra	56553038	0 [REDACTED]
	Doctora	57473800 ext 5442	

<b>Vigencia del Proyecto.</b>			
Fecha de inicio del proyecto		febrero	2015
Fecha tentativa de finalización.		febrero	2018





## FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

### PROTOCOLO PARA EL USO DE ANIMALES EN INVESTIGACIÓN.

- 1) Institución en donde se realizará el proyecto.

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán"

- 2) Objetivos generales y específicos del protocolo:

#### Objetivo general.

Determinar el efecto del portafolio dietario sobre la función cognitiva y la composición de la microbiota intestinal en un modelo animal de obesidad inducido por dieta

#### Objetivos específicos.

1. Estudiar el efecto del portafolio dietario sobre la ganancia de peso y la ingesta de alimento en un modelo animal de obesidad inducido por dieta (OID)
2. Determinar la concentración de glucosa, triglicéridos, colesterol total, colesterol LDL, leptina e insulina en ratas con obesidad inducida por dieta y el efecto del portafolio dietario en los mismos
3. Evaluar el gasto calórico y el cociente respiratorio en ratas con OID que consuman el portafolio dietario
4. Determinar la curva de tolerancia a la glucosa en animales con OID, previa y posteriormente al tratamiento con un portafolio dietario
5. Identificar las principales phylas de microorganismos de la microbiota intestinal
6. Determinar la abundancia de mRNA involucrados en la lipogénesis y la oxidación de ácidos grasos así como de SREBP-1, FAS, PPAR- $\alpha$  y CPT-1
7. Analizar histológicamente hígado, intestino, tejido adiposo y cerebro
8. Estudiar la formación de las especies reactivas de oxígeno (ERO) en cerebro de ratas con obesidad inducida por dieta
9. Evaluar la función cognitiva en ratas con OID y el efecto neuroprotector del PD

- 3) Justificación del experimento y los procedimientos en el uso de animales:

El consumo de alimentos funcionales, como lo es el nopal que contiene diferentes tipos de polisacáridos así como su actividad antioxidante podría jugar un papel importante como prebiótico en la modificación de la microbiota intestinal y en la reducción de especies reactivas de oxígeno debido a su actividad antioxidante en un modelo de obesidad inducido por la dieta alta en grasa saturada y azúcar en el agua. La adición de otros alimentos funcionales como la curcuma, la proteína de soya y aceite de chía pudieran ejercer un efecto sinérgico que podría retrasar el desarrollo de un daño cognitivo.

Se ha demostrado con estudios previos en el laboratorio que el nopal deshidratado logra disminuir los picos postprandiales de glucosa en sangre en pacientes con DMT2, además de demostrar que dicho alimento presenta un índice glucémico e insulémico bajo. Se ha reportado que las pectinas aisladas del nopal provocan una disminución de lípidos y colesterol en sangre de conejillos de indias y el consumo de nopal a largo plazo disminuye los niveles de EROs, lipoperoxidación y la esteatosis hepática. El poder evitar los picos postprandiales de glucosa en



## FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

la sangre mediante la ingesta de ciertos alimentos, como es el nopal, podría mejorar el desempeño cognitivo ya sea en sujetos obesos o con enfermedades metabólicas, así como en sujetos sanos.

Por otra parte, se sabe que la planta *Salvia hispánica* originaria del continente americano y ampliamente consumido en la era precolombina, contiene gran cantidad de ácidos grasos alfa- $\omega$ -3 y alfa- $\omega$ -6 en un ratio 18:2, lo cual ofrece grandes beneficios para la salud como son disminución de TG y colesterol en plasma. Además contiene diversos flavonoides (miricetina, quercetina, kamperol), y ofrece actividad anti-hipertensiva, anti-inflamatoria, y antidiabética. Hasta el momento, no existen reportes científicos sobre la actividad de la semilla de chí a nivel central, ni su efecto en animales obesos. Por su parte, las isoflavonas presentes en la soya (genisteína y daidzeína) poseen importante actividad anti-apotótica y efectos neuroprotectores en mujeres menopáusicas, además de haber demostrado su acción benéfica en bioquímica sanguínea al restablecer los parámetros asociados al SM. Sin embargo, hasta donde sabemos no existen reportes sobre su acción neuroprotectora. La cúrcuma, derivado de la raíz *Curcuma longa*, posee importante actividad anti-inflamatoria, anti-oxidante y anti-proliferativa. La cúrcuma ha mostrado tener importantes efectos benéficos en diversos modelos animales de la EA, al evitar la generación y agregación de  $\beta$ , inhibiendo la actividad de la acetilcolinesterasa, disminuyendo la inflamación y el estrés oxidativo. Además de sus efectos neuroprotectores, la cúrcuma también ofrece protección anti-hiperglicemia y disminuye la inflamación inducida por la obesidad en modelos animales. Sin embargo, hasta el momento no se ha descrito el efecto neuroprotector de la raíz completa, *turmerica longa*, en modelos de obesidad inducida por dieta.

#### 4) Clasificación del proyecto de acuerdo al nivel de invasividad en los animales.

##### **Categoría A**

Experimentos o ejercicios de enseñanza que involucran animales invertebrados, embriones de vertebrados, huevos embrionados de aves o de reptiles hasta antes del 90% de su total desarrollo, órganos aislados, tejidos y células vivas.

##### **Categoría B.**

Experimentos o ejercicios de enseñanza que se espera produzcan poca o ninguna angustia, incomodidad o dolor en especies animales vertebradas.

##### **Categoría C**

Experimentos o ejercicios de enseñanza que provocan angustia leve, molestia o dolor leve de corta duración en animales vertebrados. Los procedimientos dentro de esta categoría representan una atención adicional en proporción del nivel y la duración de las molestias, la angustia o el dolor inevitables. Los ejercicios de enseñanza que involucran procedimientos dentro de esta categoría requieren de una fuerte justificación de sus objetivos académicos.

##### **Categoría D**

Experimentos que provocan angustia, molestia o dolor significativo e inevitable en especies vertebradas. Los experimentos en esta categoría exigen la responsabilidad explícita del investigador para buscar diseños experimentales que aseguren que las molestias, la angustia o el dolor del animal se minimicen o se eliminen.

##### **Categoría E**

Procedimientos que involucran infligir angustia severa o dolor, por encima del umbral de tolerancia, en animales vertebrados conscientes, no anestesiados. Los experimentos en esta categoría no se aprobarán sin la justificación completa, profunda y detallada por parte del investigador responsable del proyecto.

Para más información consultar: [www.ccac.ca/Documents/Standards/Guidelines/Spanish/ANEX15B.pdf](http://www.ccac.ca/Documents/Standards/Guidelines/Spanish/ANEX15B.pdf)



## FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

Categoría:	A:	B: X	C:	D:	E:
------------	----	------	----	----	----

- 5) Justificación de la cantidad de animales participantes en el estudio tomando en cuenta los principios básicos de las tres "R's", remplazo, reducción y refinamiento.

**Para mayor información consultar:**

<http://ec.europa.eu/health/opinions/en/non-human-primates/glossary/tuv/three-rs-principle.htm>

Se decidió trabajar con ratas Wistar ya que por experiencias previas en el laboratorio se ha desarrollado de manera exitosa un modelo de obesidad inducida por dieta, el cual se acerca más a la realidad en la actualidad sobre los pacientes obesos, con riesgo de desarrollo de otras enfermedades crónico-degenerativas, por lo que el estudio en modelo *in vivo* nos da una mejor perspectiva de la realidad

Cada uno de los grupos experimentales tendrá una n=6, ya que esta es la mínima cantidad necesaria para obtener resultados relevantes, de acuerdo a otros estudios en modelos animales de rata.

Finalmente, los animales serán sometidos a procedimientos refinados, en los que la angustia o el dolor generado sea mínimo o nulo

- 6) Describir como se realizará la transportación o movilización de los animales experimentales, en caso de ser necesario.

No se requerirá el transporte o movilización de animales.

- 7) Mencione el número y las especies animales, así como el género que serán usados en las actividades de este protocolo.

Género – Especie.	Cantidad	Rango de peso	Rango de edad	Sexo
Ratas- Wistar	48	180-220	3-4 semanas	machos
No. de Grupos experimentales:		8		
No. de animales por grupo:		6		
No. TOTAL DE ANIMALES:		48		

- 8) Especificar el tiempo que permanecerán los animales en el bioterio.

Los animales permanecerán en el bioterio entre 9 y 10 meses.

- 9) Procedimientos que se realizarán con los animales.



**FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.**

Procedimiento	NO	SI	Frecuencia, cantidad y vía.
Restricción de agua y/o alimento por más de 8 horas.	X		
Toma de muestra sanguínea.		X	Dos veces Posterior al periodo de inducción a obesidad via senoretroorbital, 1 mL e inmediatamente después del sacrificio mediante punción cardíaca para cuantificar parámetros bioquímicos
Colocación de cánula.	X		
Técnica para modificar conducta.	X		
Inoculaciones de agentes.		X	En la dieta de ingesta diaria
Procedimientos quirúrgicos con recuperación.	X		
Procedimientos quirúrgicos sin recuperación.	X		
Uso de adyuvantes (indicar cuál)	X		
Estudios LD50 o ID50	X		
Restricción física (máximo 6 horas)	X		
Restricción física (menos de 6 horas)	X		
Confinamiento o aislamiento		X	Únicamente durante la prueba de calorimetría, se mantendrán solos en una caja metabólica durante un día.
Producción de anticuerpos monoclonales o policlonales.	X		
Inducción de lesiones	X		
Agentes teratogénicos o carcinogénicos	X		
Sustancias químicas tóxicas	X		
Implantes	X		
Estudios estereotáxicos.	X		
Otros:			

10) Describir detalladamente los procedimientos a realizar incluyendo material, sujeción, vías de administración o toma de muestra, frecuencia, número de veces de muestreo, volumen de aplicación y volumen de toma de muestra, etc.

A) Se utilizarán 8 grupos con una n=6 por grupo, ent total 48 ratas Wistar.

- ⇒ Tratamiento 1 (Control): Dieta con caseína al 20% de acuerdo a las recomendaciones del AIN-93 (American Institute of Nutrition).
- ⇒ Tratamiento 2 (DAGS+5% S): Dieta alta en grasa saturada + 5% de sacarosa en el agua de bebida
- ⇒ Tratamiento 3 (DAGS +5% fructosa): Dieta alta en grasa saturada + 5% de fructosa en el agua de bebida.
- ⇒ Tratamiento 4 (DAGS+5% S -AIN-93): Dieta alta en grasa saturada + 5% de sacarosa en el agua de bebida, seguida de la dieta con 20% de caseína de acuerdo a las recomendaciones del AIN-93



## FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

- ⇒ Tratamiento 5 (DAGS+5% S+PD): Dieta alta en grasa saturada + 5% de sacarosa en el agua de bebida, seguida de la dieta con 20% de aislado soya de acuerdo a las recomendaciones del AIN-93 con 5% de nopal y 7% de grasa proveniente de la chía
- ⇒ Tratamiento 6 (DAGS+5% S +5% de nopal): Dieta alta en grasa saturada + 5% de sacarosa en el agua de bebida+ 5% de nopal
- ⇒ Tratamiento 7 (DAGS+5% F - AIN-93): Dieta alta en grasa saturada + 5% de fructosa en el agua de bebida, seguida de la dieta con 20% de caseína de acuerdo a las recomendaciones del AIN-93
- ⇒ Tratamiento 8 (DAGS+5% F+PD): Dieta alta en grasa saturada + 5% de fructosa en el agua de bebida, seguida de la dieta con 20% de aislado soya de acuerdo a las recomendaciones del AIN-93 con 5% de nopal y 7% de grasa proveniente de la chía

B) Para estudiar el efecto del consumo del nopal en un modelo animal de OID, se pretende utilizar ratas Wistar macho que se mantendrán a temperatura controlada ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ), bajo ciclos de luz/oscuridad de 12h/12h y 50-55% de humedad.

Las ratas se dividirán en 3 grupos:

- A. El grupo control (n=6) que consumirá la dieta AIN-93
- B. El grupo obeso con una dieta alta en grasa saturada +5% sacarosa en el agua (n=24)
- C. El grupo obeso con una dieta alta en grasa saturada +5% fructosa en el agua (n=18)

Los grupos serán alimentados con estas dietas por un periodo de 7 meses, posteriormente el grupo B se dividirá en 4 grupos y se alimentaran por 2 meses con las siguientes dietas:

- 1. AIN-93 (caseína al 20%)
- 2. DAGS+ 5%S (dieta alta en grasa saturada y 5% de azúcar en el agua)
- 3. DAGS +5%S + 5% nopal (dieta alta en grasa saturada y 5% de azúcar en el agua +5% de nopal)
- 4. DAGS + 5%S + PD (dieta alta en grasa saturada y 5% de azúcar en el agua + PD)

El grupo C se dividirá en 2 grupos:

- 1. AIN-93 (caseína al 20%)
- 2. DAGS +5% F (dieta alta en grasa saturada y 5% de fructosa en el agua)
- 3. DAGS +5%F + PD (dieta alta en grasa saturada y 5% de fructosa en el agua + PD)

Durante el periodo de inducción de obesidad (7 meses) así como durante el consumo de la dieta posterior a la obesidad por 3 meses, se tendrá un registro del peso corporal de 2 veces por semana, de la ingesta calórica y antes y después del cambio de dieta se realizará una prueba de tolerancia a la glucosa (CTG), al administrar sacarosa vía intraperitoneal 2g/kg y tomar muestra sanguínea de la cola del animal a los 15, 30, 45, 60, 90 y 120 minutos posteriores a la administración. También se hará la determinación del cociente respiratorio y el gasto calórico mediante una calorimetría indirecta, así como la determinación de parámetros bioquímicos séricos (Glucosa, triglicéridos, insulina, colesterol total, LDL y HDL, leptina), mediante una toma de muestra sanguínea y posterior determinación con métodos colorimétricos. Además de tomar una muestra de heces para el análisis de la microbiota intestinal previo y posterior al consumo del portafolio dietario.

Días antes de finalizar los regímenes alimenticios todos los grupos experimentales se



## FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

- 11) Si el protocolo incluye la restricción de movimiento de los animales consientes, indique el grado y tiempo de inmovilización y los dispositivos para lograrlo.

Los animales no se privarán de movimiento, ni se les inmovilizará.

- 12) Agentes analgésicos, anestésicos y/o tranquilizantes que se utilizarán.

Especie	Agente	Dosis	Vía de admón.	Frecuencia.
Rata	Sevoflurano		Inhalada	1 vez

- 13) ¿Qué parámetros empleará para conocer el grado de Anestesia o analgesia del agente a utilizar?

Se considerará que el animal está anestesiado cuando no haya una reacción (reflejo) ante un pellizco de cola (gentilmente se genera presión en la porción proximal de la cola, puede ser con los dedos o con una pinza). Otra técnica consiste en pellizcar las garras, ya sea con los dedos o con pinza, un animal anestesiado no debe tener una respuesta de retiro de la pata.

Además, puede considerarse que permanezca en posición decúbito dorsal sin moverse y que las vibrisas no estén en movimiento.

También se monitorean los signos vitales, dado que la frecuencia cardiaca y respiratoria se incrementan si no está anestesiado.

- 14) Cuando el protocolo incluya procedimientos invasivos (cirugías) especificar los cuidados pre y post-operatorios (utilización de antibióticos, analgésicos, limpieza y desinfección).

No habrá procedimientos quirúrgicos

- 15) Evaluación de signos de dolor de su proyecto piloto.

Los parámetros generales a observar son:

- Cambios en peso corporal
- Apariencia física: pilo-erección, posturas indicativas de dolor, etc.
- Comportamiento: aparición de comportamientos estereotipados, agresividad, cambios en comportamiento social...
- Respuesta a estímulos externos
- Signos clínicos:
  - i. Respiración: normal, laboriosa...
  - ii. Temperatura
  - iii. Temblores



## FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

- iv. Convulsiones
- v. Descarga nasal, salivación

Escala: 0 si es normal, 1 si el parámetro en cuestión se ve ligeramente alterado, 2 si está afectado y 3 si está muy afectado.

Parámetro	0	1	2	3
a) Peso corporal			X	
b) Apariencia	X			
c) Signos clínicos (Temp., FC., FR., etc.)	X			
d) Conducta espontánea.	X			
e) Conducta provocada.	X			

### 16) ¿Cuáles serán los criterios para establecer el "punto final humanitario"?

#### Criterios de punto final

Basándose en los parámetros seleccionados para evaluar la condición del animal hay que determinar en que momento se procederá a la eutanasia humanitaria del mismo. Los parámetros observados pueden "cuantificarse" asignando valores arbitrarios según la gravedad que presenten.

- a. Variación de peso corporal:
  - 1. Aceptable una disminución del 5-10%
  - 2. Moderada del 10-20%
  - 3. Substancial > al 20% (criterio de punto final).
- b. Los valores, como la postura, piloerección, comportamiento social etc., pueden valorarse según la escala:
  - 1. 0 si es normal.
  - 2. 1 si el parámetro en cuestión se ve ligeramente alterado
  - 3. 2 si está afectado
  - 4. 3 si está muy afectado.

Hay que tener en cuenta que no existe un criterio de punto final adaptable a todos los procedimientos y es el **Investigador Responsable** del experimento el que, basándose en observaciones de ensayos piloto o por datos de experimentos similares ya publicados, debe confeccionar su propio protocolo de determinación de punto final de manera que cumpla la normativa vigente en cuanto a protección de los animales utilizados en experimentación y por otra se evite la pérdida de datos del estudio.

Se tomará en cuenta que los tratamientos a evaluar tienen un efecto modesto en la reducción del peso corporal, por lo que es de esperar que éste, cambie.

Sin embargo, como criterios de punto final, se pueden considerar ciertas variables, por ejemplo: el peso corporal, cambios en la conducta motora, el consumo de alimento, el consumo de agua, la temperatura, que presente convulsiones o hemorragias, entre otras. La escala será la siguiente y se asignará un score final al cuantificar los valores asignados a cada variable.

- 0 si es normal.
- 1 si el parámetro en cuestión se ve ligeramente alterado
- 2 si está afectado
- 3 si está muy afectado.

Cuando un score sea de 3 en alguna variable o que en total sumen >5 como score final, se considerará que al animal habrá que hacerle la eutanasia (asfixia con CO<sub>2</sub>)



## FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

17) ¿Cuál será el método de eutanasia que utilizará?

Sobredosis con anestesia inhalado (sevoflurano)

Recomendaciones para el Sacrificio Humanitario de los Animales de Experimentación.			
Especie	Método	Dosis	Via
Ratón	Pentobarbital Asfixia con CO <sub>2</sub>	210 mg/kg	IV, IP
Rata	Pentobarbital Asfixia con CO <sub>2</sub>	120 mg/kg	IV, IP
Jerbo	Pentobarbital Asfixia con CO <sub>2</sub>	270 mg/kg	IV, IP
Conejo	Pentobarbital Pistola de perno cautivo Asfixia con CO <sub>2</sub>	120 mg/kg	IV, IP
Cerdo	Pentobarbital	90 mg/kg	IV
Rana	Pentobarbital	100 mg/kg	IP

\* Método aceptado únicamente bajo ciertas condiciones establecidas por el comité. Su aplicación requiere una justificación científica por parte del Investigador Responsable

18) El protocolo representa riesgo biológico?

a) ~~No~~                      b) Si

Si la respuesta es afirmativa, defina el Nivel de Bioseguridad para Animales (ABSL) requerido. Se recomienda consultar la clasificación del Center for Disease Control and Prevention.


[http://www.cdc.gov/biosafety/publications/bmb15/BMBL5\\_sect\\_V.pdf](http://www.cdc.gov/biosafety/publications/bmb15/BMBL5_sect_V.pdf)

19) ¿Cuál será el destino final de los animales utilizados en el proyecto experimental?

Los cadáveres de los animales se almacenarán en bolsas amarillas para residuos sólidos patológicos y se llevarán a un congelador destinado para el desecho de dichos residuos, para posteriormente ser entregados a la empresa contratada para su manejo posterior.

Me comprometo a conducir mi proyecto de Investigación de acuerdo con los lineamientos éticos y humanitarios que rigen la experimentación con animales, así como cumplir los aspectos relativos al cuidado, manejo y uso de los animales de laboratorio que se describen en la NOM-062-ZOO-1999.

Nombre y firma del Investigador Responsable

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Nimbe Torres Torres





**FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.**

<b>Integrantes de la CINVA</b>	<b>Cargo</b>	<b>Firma</b>
Dra. Norma Bobadilla Sandoval	Coordinadora	
Dr. Jorge Alberto Barrios Payán	Secretario	
M. en C. Octavio Villanueva Sánchez	Vocal	
Dra. Elena Zambrano González	Vocal	
Dr. Alejandro Zentella Dehesa	Vocal	
Dra. Nimbe Torres y Torres	Vocal	
Dr. Gonzalo Torres Villalobos	Vocal	
Dra. María Elena Flores Carrasco	Vocal Externo	

Folio del registro: FNU-1444-15/19-1

Notice: Undefined index: 2006\_comites\_idComite in C:\Program Files (x86)\Apache Software Foundation\Apache2.2\htdocs\latis\include\latis\utils.php on line 2776 Notice: Undefined index: 2006\_comites\_idComite in C:\Program Files (x86)\Apache Software Foundation\Apache2.2\htdocs\latis\include\latis\utils.php on line 2776 Notice: Undefined index: 2006\_comites\_idComite in C:\Program Files (x86)\Apache Software Foundation\Apache2.2\htdocs\latis\include\latis\utils.php on line 2776 Notice: Undefined index: 2006\_comites\_idComite in C:\Program Files (x86)\Apache Software Foundation\Apache2.2\htdocs\latis\include\latis\utils.php on line 2776 Notice: Undefined index: 2006\_comites\_idComite in C:\Program Files (x86)\Apache Software Foundation\Apache2.2\htdocs\latis\include\latis\utils.php on line 2776 Notice: Undefined index: 2006\_comites\_idComite in C:\Program Files (x86)\Apache Software Foundation\Apache2.2\htdocs\latis\include\latis\utils.php on line 2776

Formato Único de Registro

**(0) Comentarios**

Título del proyecto:

Efecto de un portafolio dietario (semilla de chia, nopal deshidratado, aislado de proteína de soya, y raíz turmerica longa) en un modelo de obesidad inducido por dieta en ratas Wistar macho y el impacto en la función cognitiva y la composición de la micro

Tipo de proyecto:

Investigación Experimental

Antecedentes:

**ANTECEDENTES:**

**A. Alimentos funcionales**

El termino de Alimento Funcional fue propuesto por primera vez en Japón en la década de los 80's y se refiere a aquellos alimentos en forma natural o procesada que además de sus componentes nutritivos contiene componentes adicionales (compuestos bioactivos) que favorecen a la salud, la capacidad física y el estado mental de quien lo consume ayudando también a la prevención, reducción y tratamiento de enfermedades (Chasquibol S.N. *et al*, 2003). Los compuestos bioactivos son constituyentes presentes en alimentos en pequeñas cantidades y han sido estudiados para evaluar sus efectos sobre la salud. Estos compuestos han sido agrupados por su variación en estructura química y función. Dentro de estos compuestos se encuentran: polifenoles, flavonoides, fitoestrogenos, carotenos, compuestos organosulfurados, esteroides,  $\beta$ -glucanos, isotiocianatos, monoterpenos, vitaminas, fibra dietética, oligosacáridos, prebióticos, tocoferoles, entre otros. (Pratt DE, 1992)

**B. Obesidad y deterioro cognitivo**

La obesidad y el síndrome metabólico (SM) representan un factor de riesgo para el desarrollo de demencias e incluso de la enfermedad de Alzheimer (K. Yaffe, 2005; 2007; R. Roberts, 2010; Y. Katsumata, 2012 y V. Solfrizzi, 2011). En modelos animales de obesidad inducida por dieta se ha podido demostrar que la obesidad causa deterioro cognitivo principalmente en tareas dependientes del hipocampo (Davidson, 2013). Estudios preliminares en nuestro laboratorio han demostrado que ratas con obesidad inducida por una dieta alta en grasa saturada y azúcar en el agua tienen un deterioro en la memoria a corto plazo que indicaría un daño en la memoria espacial dependiente del hipocampo y que la adición de alimentos como el nopal que contiene polifenoles, vitamina C y beta carotenos disminuye el deterioro cognitivo leve.

Figura 1 Tiempo que tardan las ratas en reconocer un lugar previamente explorado. Ratas control, OC; ratas con obesidad y alimentadas con la dieta control, OB; ratas obesas, OCN; ratas obesas alimentadas con dieta control + nopal y ON; ratas obesas alimentadas con nopal.

Se ha reportado que el síndrome metabólico incrementa el riesgo de desarrollar enfermedad de Alzheimer (EA) (Davidson T.L. et al, 2013; Farr S.A. et al, 2008; Katsumata Y et al, 2012; Roberts R et al.2010 y Solfrizzi V et al, 2011) e impedimento cognitivo leve (ICL) en varios grupos étnicos (Boitard et al, 2012). Sin embargo, los mecanismos por lo que el SM desencadena un deterioro cognitivo aún son desconocidos. La presente propuesta pretende determinar como las alteraciones metabólicas asociadas al SM ocasionan daño cognitivo en ratas, así como evaluar el efecto neuroprotector de alimentos funcionales para evitar la neurodegeneración.

Recientemente se ha logrado demostrar que el ICL es una condición patológica con un alto grado de progresión hacia la enfermedad de Alzheimer (EA). El ICL podría predecir la aparición de la EA en menos de 10 años y se puede diferenciar claramente de los cambios ocurridos durante una vejez normal (Freeman LR y Sambamurt K, 2009;). Stranahan et al AM, 2008

Los modelos animales de obesidad inducida por dieta generan no solo cambios metabólicos en el perfil de lípidos y niveles de glucosa en sangre, sino también estrés oxidativo, cambios en la microbiota, inflamación y daño a nivel central que conllevan a deterioro cognitivo. Por lo tanto, los modelos animales de obesidad y SM representan un estado de ICL o un estadio temprano de demencia (Kanoski S, Davidson T, 2010)

Existen algunos datos importantes que ayudan a entender la asociación entre el SM u obesidad y el desarrollo de la EA. Lee y colaboradores han mostrado que el tejido adiposo sobre-expresa la proteína precursora beta-amiloide (APP) y secreta la proteína beta amiloidea ( $\beta$ a) al flujo sanguíneo (Benton D, 2008), ambas proteínas relacionadas con la patogénesis de la EA. Más aún, pacientes con SM presentan un incremento de agentes pro-inflamatorios (TNF-alfa, citocinas) quienes actúan en diferentes órganos incluyendo el cerebro, causando neuroinflamación. La EA se caracteriza por un grado severo de neuroinflamación ocasionando neurodenegeración y esta última a su vez, mayor neuroinflamación (Yaffe et al 2004). Por otra parte, el consumo de dietas altas en grasa saturada y azúcares que inducen obesidad, han mostrado daño cognitivo tanto en estudios clínicos como en modelos animales. Se ha observado que animales sujetos al consumo de una dieta alta en grasa saturada y azúcares presentan daño en la barrera hematoencefálica, menos neurogénesis, disminución de contactos sinápticos y de BDNF, así como alteraciones en los niveles de glutamato y su neurotransmisión en hipocampo, además de incrementos en la activación de microglia y macrófagos en cerebro (Pancani T. et al, 2013)

Por otra parte, modelos animales de obesidad inducida por dieta demuestran que la resistencia a la insulina juega un papel muy importante en la integridad y funciones cognitivas dependientes del hipocampo (Stranahan et al AM, 2008). Estos datos corroboran que el deterioro cognitivo inducido por una dieta alta en grasa saturada tiene un origen multifactorial y resalta la importancia de estudiar los diversos componentes en conjunto.

### **C. Obesidad, deterioro cognitivo y Alimentos funcionales**

Previos estudios en nuestro laboratorio han demostrado el efecto benéfico de diferentes tipos de alimentos. Por lo cual hemos diseñado un conjunto de alimentos funcionales que pudieran retrasar o disminuir los diferentes parámetros involucrados en el daño cognitivo y que podrían ofrecer una alternativa terapéutica para prevenir o disminuir el deterioro cognitivo inducido por dietas altas en grasas. La proteína de soya se utilizará por ser una proteína de origen vegetal de buena calidad con una calificación química de 1, que evita los picos posprandiales de glucosa e insulina en ratones

(Arellano Martínez, 2014), ratas y en pacientes con diabetes tipo 2 (López R, 2014) y su efecto en la disminución de lípidos. También se utilizará nopal deshidratado debido a la presencia de polifenoles, vitamina C y beta carotenos con actividad antioxidante, a la presencia de fibra soluble e insoluble y a la presencia de polisacáridos complejos como pectina y mucilagos que pueden servir como prebióticos. Estudios preeliminares en nuestro laboratorio han demostrado un aumento en *Akkermansia* después del consumo de nopal, que se ha visto relacionado con el consumo de prebióticos (Amandine E, 2013). Se ha reportado que cambios en la microbiota pueden modificar la expresión de genes en regiones clave del cerebro. También se utilizará aceite de chía rico en ácidos grasos omega 3 que se ha demostrado que pueden proteger del daño cognitivo y de la demencia (Sydenham E, 2006) Se utilizará la cúrcuma ya que mejora la memoria espacial y disminuye el daño oxidativo debido a sus propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y neuroprotectoras.

#### **D. El papel de la microbiota en la obesidad y deterioro cognitivo**

El tubo digestivo alberga un ecosistema bacteriano complejo cercano a los 100 trillones ( $10^{14}$ ) de microorganismos que forman la microbiota intestinal. Esta microbiota intestinal ha evolucionado junto con el ser humano, adaptándose y conviviendo con él en una estrecha relación simbiótica (Bäckhed F, 2004). La microbiota ejerce funciones nutricionales, metabólicas y protectoras que la vuelven indispensable para el huésped mientras que el huésped le proporciona nutrientes y condiciones adecuadas para su crecimiento (Bäckhed F. 2007). La presencia de la microbiota intestinal, de hecho, impacta fuertemente en la expresión de genes en la mucosa intestinal del huésped, por ejemplo puede inducir la expresión de genes implicados tanto en la defensa del organismo y la regulación de la función intestinal de barrera como en la vascularización del epitelio y la digestión/absorción de nutrientes.

El incremento de la prevalencia de obesidad y enfermedades crónico-degenerativas asociadas a la misma durante las últimas décadas es alarmante y no puede ser atribuido únicamente a factores genéticos. La investigación está señalando actualmente a la microbiota intestinal como factor ambiental que afecta a la obesidad, ya que la microbiota intestinal contribuye al metabolismo energético y al desarrollo de obesidad en el hospedero (Cani PD, 2009).

Los procesos biológicos del envejecimiento pueden implicar un papel de la microbiota intestinal. Aspectos fisiológicos relacionados con la homeostasis inmunitaria y el balance energético están profundamente influenciados por la microbiota. La desregulación del sistema inmune caracteriza la vejez y constituye un mecanismo patógeno importante que subyace a la fragilidad y las enfermedades crónicas asociadas con la edad. Se ha relacionado con la edad, el cambio en la microbiota intestinal que tiene una contribución a un estado inflamatorio global en los ancianos. Una mejor comprensión de la naturaleza y los factores determinantes de la relación huésped-microbio en la vejez puede traducirse en estrategias que promuevan un envejecimiento saludable y mejorar la calidad de la vida (Rehman T, 2012)

Por otro lado, considerando que la obesidad es uno de los principales factores de riesgo con respecto a la aparición de diabetes de tipo 2, enfermedades vasculares y neurodegenerativas como Alzheimer, varios grupos han especulado con la idea de que la microbiota intestinal podría ejercer un impacto sobre estas y otras enfermedades crónico-degenerativas (Gary SR, 2008). Además, es importante considerar que la resistencia a la

insulina es una patología concomitante con la obesidad y se correlaciona con inflamación crónica de baja intensidad (Franklin Tsai, 2009). Basándose en datos experimentales sobre el impacto que ejerce la microbiota intestinal sobre la obesidad, otros autores han propuesto que la microbiota intestinal pudiera contribuir al inicio de la resistencia a la insulina y al estado inflamatorio del hospedero.

Finalmente, la mejor comprensión de la composición y funcionamiento de la microbiota intestinal ha permitido el desarrollo de prebióticos y probióticos que pueden ser considerados como herramientas útiles para mantener el equilibrio armonioso de la flora intestinal a través del manejo de la dieta del individuo.

**Definición del problema:**

La obesidad y el síndrome metabólico (SM) representan un factor de riesgo para el desarrollo de demencias e incluso de la enfermedad de Alzheimer, por lo que es necesario conocer diferentes tipos de estrategias dietarias basadas en evidencia científica para disminuir el riesgo de presentar daño cognitivo. El uso de alimentos funcionales con actividad antioxidante podría reducir el daño oxidativo y tener un efecto neuroprotector para evitar la neurodegeneración.

**Justificación:**

El consumo de alimentos funcionales, como lo es el nopal que contiene diferentes tipos de polisacáridos así como su actividad antioxidante podría jugar un papel importante como prebiótico en la modificación de la microbiota intestinal y en la reducción de especies reactivas de oxígeno debido a su actividad antioxidante en un modelo de obesidad inducido por la dieta alta en grasa saturada y azúcar en el agua. La adición de otros alimentos funcionales como la curcuma, la proteína de soya y aceite de chía pudieran ejercer un efecto sinérgico que podría retrasar el desarrollo de un daño cognitivo.

Se ha demostrado con estudios previos en el laboratorio que el nopal deshidratado logra disminuir los picos postprandiales de glucosa en sangre en pacientes con DMT2, además de demostrar que dicho alimento presenta un índice glucémico e insulémico bajo. Se ha reportado que las pectinas aisladas del nopal provocan una disminución de lípidos y colesterol en sangre de conejillos de indias y el consumo de nopal a largo plazo disminuye los niveles de EROs, lipoperoxidación y la esteatosis hepática. El poder evitar los picos postprandiales de glucosa en la sangre mediante la ingesta de ciertos alimentos, como es el nopal, podría mejorar el desempeño cognitivo ya sea en sujetos obesos o con enfermedades metabólicas, así como en sujetos sanos.

Por otra parte, se sabe que la planta *Salvia hispánica* originaria del continente americano y ampliamente consumido en la era precolombina, contiene gran cantidad de ácidos grasos  $\alpha$ - $\omega$ -3 y  $\alpha$ - $\omega$ -6 en un ratio 18:2, lo cual ofrece grandes beneficios para la salud como son disminución de TG y colesterol en plasma. Además contiene diversos flavonoides (miricetina, quercetina, kamperol), y ofrece actividad anti-hipertensiva, anti-inflamatoria, y antidiabética. Hasta el momento, no existen reportes científicos sobre la actividad de la semilla de chía a nivel central, ni su efecto en animales obesos. Por su parte, las isoflavonas presentes en la soya (genisteina y daidzeina) poseen importante actividad anti-apotótica y efectos neuroprotectores en mujeres menopáusicas, además de haber demostrado su acción benéfica en bioquímica sanguínea al restablecer los parámetros asociados al SM. Sin embargo, hasta donde sabemos no existen reportes sobre su acción neuroprotectora. La cúrcuma, derivado de la raíz *curcuma longa*, posee importante actividad anti-inflamatoria, anti-oxidante y anti-proliferativa. La cúrcuma ha mostrado tener importantes efectos benéficos en diversos modelos animales de la EA, al evitar la generación y agregación de  $\beta$ ,

inhibiendo la actividad de la acetilcolinesterasa , disminuyendo la inflamación y el estrés oxidativo. Además de sus efectos neuroprotectores, la cúrcuma también ofrece protección anti-hiperglicemia y disminuye la inflamación inducida por la obesidad en modelos animales. Sin embargo, hasta el momento no se ha descrito el efecto neuroprotector de la raíz completa, turmerica longa, en modelos de obesidad inducida por dieta.

**Hipótesis:**

En el presente protocolo se plantea usar una combinación de distintos alimentos funcionales (semilla de chía, nopal deshidratado, aislado de proteína de soya, y raíz turmerica longa) en animales con obesidad inducida por dieta. Debido a la presencia de fibra soluble e insoluble, flavonoides, fitoesteroles, polifenoles,  $\beta$ -carotenos, acidos grasos omega 3, antioxidantes, proteína vegetal en el portafolio dietario, su consumo tendrá un efecto en la disminución de firmicutes y un incremento en bacteriodetes, además de mostrar una mejora en parámetros bioquímicos asociados a obesidad, así como un efecto neuroprotector en ratas obesas, debido a la disminución del estrés oxidativo en el cerebro.

**Fecha estimada de inicio:**

19/01/2015

**Fecha estimada de término:**

12/01/2018

**Comisión a la que somete**

**¿Incluye documentos anexos?:**

Si

**Investigadores participantes**

**(0) Comentarios**

Investigador	Participación	Orden de participación	Investigador responsable
TORRES Y TORRES, NIMBE	Investigador responsable	1	Si
Perez Cruz, Claudia	Investigador responsable	2	No
Sánchez Tapia, Mónica Todd curie	Investigador asociado	3	No
Tauqeer Unnisa, syeda	Investigador asociado	4	No
Tovar Palacio, Armando Roberto	Investigador asociado	4	No

**Población vulnerable**

**(0) Comentarios**

**Población vulnerable vinculado al protocolo**

Ninguna de las anteriores

**Otra población::**

**Objetivos**

**(0) Comentarios**

**Objetivo:**

**Principal**

Determinar el efecto del portafolio dietario sobre la función cognitiva y la composición de la microbiota intestinal en un modelo animal de obesidad inducido por dieta

**Tipo de objetivo:**

General

**Objetivo:**

**Específicos**

- Estudiar el efecto del portafolio dietario sobre la ganancia de peso y la ingesta de alimento en un modelo animal de obesidad inducido por dieta (OID)
- Determinar la concentración de glucosa, triglicéridos, colesterol total, colesterol LDL, leptina e insulina en ratas con obesidad inducida por dieta y el efecto del portafolio dietario en los mismos
- Evaluar el gasto calórico y el cociente respiratorio en ratas con OID que consuman el portafolio dietario
- Determinar la curva de tolerancia a la glucosa en animales con OID, previa y posteriormente al tratamiento con un portafolio dietario
- Identificar las principales phylas de microorganismos de la microbiota intestinal
- Determinar la abundancia de mRNA involucrados en la lipogénesis y la oxidación de ácidos grasos así como de SREBP-1, FAS, PPAR- $\alpha$  y CPT-1
- Analizar histológicamente hígado, intestino, tejido adiposo y cerebro
- Estudiar la formación de las especies reactivas de oxígeno (ERO) en cerebro de ratas con obesidad inducida por dieta
- Evaluar la función cognitiva en ratas con OID y el efecto neuroprotector del PD

**Tipo de objetivo:**

Específico (s)

Metodología: Diseño general

**(0) Comentarios**

Metodología gral:

A) Se utilizarán 8 grupos con una n=6 por grupo, ent total 48 ratas Wistar. Las dietas se preparan en la planta piloto del departamento de tecnología de alimentos

⇒ Tratamiento 1 (Control): Dieta con caseína al 20% de acuerdo a las recomendaciones del AIN-93 (American Institute of Nutrition).

<b>Dieta AIN-93 (CONTROL)</b>	
Ingrediente	%
Almidón	39.749
Caseína	20
Maltodextrina	13.2
Sacarosa	10
Aceite de soya	7
Celulosa	5
Mineral mix	3.5
Vitaminas mix	1
L-Cistina	0.3
Colina	0.25
TBHQ	0.0014

⇒ Tratamiento 2 (DAGS+5% S): Dieta alta en grasa saturada + 5% de sacarosa en el agua de bebida

<b>DAGS</b>	
Ingrediente	%
Almidón	23.903
Caseína	24
Maltodextrina	10.267
Sacarosa	7.778
Aceite de soya	7
Celulosa	2.5
Mineral mix	3.5
Vitaminas mix	1
L-Cistina	0.3
Colina	0.25
TBHQ	0.0014
Inulina	2.5
Manteca	17

⇒ Tratamiento 3 (DAGS +5% fructosa): Dieta alta en grasa saturada + 5% de fructosa en el agua de bebida.



- ⇒ Tratamiento 4 (DAGS+5% S -AIN-93): Dieta alta en grasa saturada + 5% de sacarosa en el agua de bebida, seguida de la dieta con 20% de caseína de acuerdo a las recomendaciones del AIN-93
- ⇒ Tratamiento 5 (DAGS+5% S+PD): Dieta alta en grasa saturada + 5% de sacarosa en el agua de bebida, seguida de la dieta con 20% de aislado soya de acuerdo a las recomendaciones del AIN-93 con 5% de nopal y 7% de grasa proveniente de la chía

<b>Portafolio dietario</b>	
Ingrediente	%
Almidón	37.3
Proteína de soya	20
Maltodextrosa	13.2
Sacarosa	10
Aceite de chia	3.8878
Nopal	5
Mineral mix	3.5
Vitaminas mix	1
L-Cistina	0.3
Colina	0.25
TBHQ	0.0014
Cúrcuma	0.0042

- ⇒ Tratamiento 6 (DAGS+5% S +5% de nopal): Dieta alta en grasa saturada + 5% de sacarosa en el agua de bebida+ 5% de nopal
- ⇒ Tratamiento 7 (DAGS+5% F - AIN-93): Dieta alta en grasa saturada + 5% de fructosa en el agua de bebida, seguida de la dieta con 20% de caseína de acuerdo a las recomendaciones del AIN-93
- ⇒ Tratamiento 8 (DAGS+5% F+PD): Dieta alta en grasa saturada + 5% de fructosa en el agua de bebida, seguida de la dieta con 20% de aislado soya de acuerdo a las recomendaciones del AIN-93 con 5% de nopal y 7% de grasa proveniente de la chía

B) Para estudiar el efecto del consumo del portafolio dietario en un modelo animal de OID, se pretende utilizar ratas Wistar macho que se mantendrán a temperatura controlada ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ), bajo ciclos de luz/oscuridad de 12h/12h y 50-55% de humedad.

Las ratas se dividirán en 3 grupos:

- A. El grupo control (n=6) que consumirá la dieta AIN-93
- B. El grupo obeso con una dieta alta en grasa saturada +5% sacarosa en el agua (n=24)
- C. El grupo obeso con una dieta alta en grasa saturada +5% fructosa en el agua (n=18)

Los grupos serán alimentados con estas dietas por un periodo de 7 meses, posteriormente el grupo B se dividirá en 4 grupos y se alimentaran por 3 meses con las siguientes dietas:

1. AIN-93 (caseína al 20%)
2. DAGS+ 5%S (dieta alta en grasa saturada y 5% de azúcar en el agua)
3. DAGS +5%S + 5% nopal (dieta alta en grasa saturada y 5% de azúcar en el agua +5% de nopal)

4. DAGS + 5%S + PD (dieta alta en grasa saturada y 5% de azúcar en el agua + PD)

El grupo C se dividirá en 3 grupos:

1. AIN-93 (caseína al 20%)
2. DAGS +5% F (dieta alta en grasa saturada y 5% de fructosa en el agua)
3. DAGS +5%F + PD (dieta alta en grasa saturada y 5% de fructosa en el agua + PD)

Durante el periodo de inducción de obesidad (7 meses) así como durante el consumo de la dieta posterior a la obesidad por 3 meses, se tendrá un registro del peso corporal de 2 veces por semana, de la ingesta calórica y antes y después del cambio de dieta se realizará una prueba de tolerancia a la glucosa (CTG), después de un ayuno durante la noche (de 6 a 8 h), se administrará sacarosa vía intraperitoneal 2g/kg y tomar muestra sanguínea de la cola del animal a los 15, 30, 45, 60, 90 y 120 minutos posteriores a la administración de la sacarosa. También se hará la determinación del cociente respiratorio y el gasto calórico mediante una calorimetría indirecta, de acuerdo a lo previamente reportado (Chavez Santoseoy, 2014). También se hará la determinación de parámetros bioquímicos séricos (Glucosa, triglicéridos, insulina, colesterol total, LDL y HDL, leptina), mediante una toma de muestra sanguínea del senoocular bajo anestesia con sevoflurano y una semana después de las pruebas conductuales para evitar interferencia

Para la determinación de la microbiota se tomara una muestra de heces previo y posterior al consumo del portafolio dietario se el DNA de la muestra y se llevara a cabo la amplificación de phylas específicas por medio de qPCR utilizando primers específicos para cada phyla

Días antes de finalizar los regímenes alimenticios todos los grupos experimentales, durante el periodo de luz, se someterán a exámenes de memoria y aprendizaje, como son el laberinto en T y el reconocimiento de objeto novedoso. Para el laberinto en T, se entrenarán a los animales en una fase de muestra donde se colocará al animal en el brazo de inicio y se permitirá que elija uno de los brazos objetivo. La división central deberá de estar en posición. Una vez realizada la elección se confinará al animal durante 30 segundos en el brazo elegido después de lo cual se retirará la puerta del brazo objetivo y se permitirá que el animal entre al brazo de inicio de donde es retirado. Dos minutos después se volverá a colocar al animal en el brazo de inicio, sin la división central, y se permitirá elegir un brazo objetivo. Dos horas después se repiten todos los pasos anteriores. Para el reconocimiento de objeto novedoso (RON) se habituarán los animales al contenedor (68 x 30 x 40 cm) durante un periodo de 30 min. Veinticuatro horas después se volverá a colocar al animal en el contenedor junto con 2 objetos de características similares por 5 min. Una vez transcurrido este tiempo se retirará al animal y los objetos. Treinta minutos después se colocará al animal en el contenedor junto con uno de los objetos utilizados y otro objeto nuevo. Se permitirá que el animal explore durante 5 minutos

Transcurridos los 10 meses, las ratas se irán sacrificando escalonadamente mediante asfixia con CO<sub>2</sub> previo a una punción cardiaca, bajo anestesia (sevoflurano) y se obtendrá el hígado, colon, cerebro y el tejido adiposo visceral (gonadal y retroperitoneal) y subcutáneo localizado en la zona inguinal e intercostal de todos los grupos y las muestras se congelarán en nitrógeno líquido y se almacenarán a -70°C hasta el día de las determinaciones. Se extraerá ARN para estudiar la expresión de los genes involucrados en la lipogénesis así como en la oxidación de ácidos grasos. Adicionalmente, parte de los tejidos (hígado y tejido adiposo) se destinará a estudios histológicos para observar la morfología y la presencia de inflamación y acumulación de grasa. Respecto al cerebro se

realizaran análisis histológico e inmunohistoquímico, para determinar marcadores de inflamación, así como número y morfología de las espinas dendríticas y estrés oxidativo

Se tomarán muestras de sangre para posteriormente separar el plasma y cuantificar parámetros bioquímicos como la glucosa, triglicéridos, leptina, colesterol HDL y LDL, mediante pruebas enzimático-colorimétricas y por último se tomarán muestras de heces para la determinación de la microbiota.

C) El tamaño de la muestra será de 6 ratas Wistar por grupo, ya que en estudios previos se ha demostrado que es el número mínimo de animales para poder observar cambios representativos en la expresión de genes

D) Las ratas son machos de peso inicial de 200g aproximadamente.

E) La asignación del tratamiento será de forma aleatorizada.

F) Se tendrán 8 grupos experimentales de tratamiento

**Metodología: Criterios de selección**

**(0) Comentarios**

**Criterios de selección del protocolo:**

A) Ratas machos de la cepa Wistar, de peso entre 180-220 g.

B) Se eliminarán del estudio las ratas que no aumenten de peso o que presenten un bajo peso, en comparación con las ratas que reciban esta dieta.

**Beneficio (s) del estudio**

**(0) Comentarios**

**Beneficio:**

**BENEFICIO DIRECTO**

Poder conocer el efecto neuroprotector de diferentes alimentos funcionales

**Tipo de beneficio:**

Beneficios directos esperados

**Beneficio:**

**BENEFICIO INDIRECTO**

Conocer los mecanismo de acción de los alimentos funcionales en un modelo de obesidad inducido por dieta

**Tipo de beneficio:**

Beneficios indirectos esperados

**Metodología: Desenlace y variables**

**(0) Comentarios**

Metodología de desenlace y variables:

Variable	Definición	Muestra	Tipo de variable	Escala de medición
Glucosa	Concentración plasmática de glucosa por ensayo enzimático	Suero	Cuantitativa continua	mg/dl
Triglicéridos	Concentración plasmática de triglicéridos por ensayo enzimático	Suero	Cuantitativa continua	mg/dl
Colesterol HDL	Concentración plasmática de colesterol HDL por ensayo enzimático	Suero	Cuantitativa continua	mg/dl
Colesterol LDL	Concentración plasmática de colesterol LDL por ensayo enzimático	Suero	Cuantitativa continua	mg/dl
SREBP-1	Medición de la expresión génica por RT-PCR	Hígado	Cuantitativa continua	Unidades arbitrarias
FAS	Medición de la expresión génica por RT-PCR	Hígado	Cuantitativa continua	Unidades arbitrarias
ACC	Medición de la expresión génica por RT-PCR	Hígado	Cuantitativa continua	Unidades arbitrarias
CPT-1	Medición de la expresión génica por RT-PCR	Hígado	Cuantitativa continua	Unidades arbitrarias
PPAR- $\alpha$	Medición de la expresión génica por RT-PCR	Hígado	Cuantitativa continua	Unidades arbitrarias
NOX	Medición de la expresión génica por RT-PCR	Hígado y tejido adiposo	Cuantitativa continua	Unidades arbitrarias
TNF- $\alpha$	Medición de la expresión génica por RT-PCR	Hígado y tejido adiposo	Cuantitativa continua	Unidades arbitrarias
PPAR- $\gamma$	Medición de la expresión génica por RT-PCR	Tejido adiposo	Cuantitativa continua	Unidades arbitrarias
XBP-1	Medición de la expresión génica por RT-PCR	Hígado y tejido adiposo	Cuantitativa continua	Unidades arbitrarias
BIP	Medición de la expresión génica por RT-PCR	Hígado y tejido adiposo	Cuantitativa continua	Unidades arbitrarias
ATF-6	Medición de la expresión génica por	Hígado y tejido	Cuantitativa continua	Unidades arbitrarias

	RT-PCR	adiposo		
Leptina	Medición de la expresión génica por RT-PCR	Tejido adiposo	Cuantitativa continua	Unidades arbitrarias
Adiponectina	Medición de la expresión génica por RT-PCR	Tejido adiposo	Cuantitativa continua	Unidades arbitrarias
APP	Medición de la expresión génica por RT-PCR	Tejido adiposo	Cuantitativa continua	Unidades arbitrarias
GFAP	Medición de la expresión génica por RT-PCR	Cerebro	Cuantitativa continua	Unidades arbitrarias
SREBP-1	Medición de la expresión proteica por medio de Western blot	Hígado	Cuantitativa continua	Unidades arbitrarias
FAS	Medición de la expresión proteica por medio de Western blot	Hígado	Cuantitativa continua	Unidades arbitrarias
PPAR- $\alpha$	Medición de la expresión proteica por medio de Western blot	Hígado	Cuantitativa continua	Unidades arbitrarias
PPAR- $\gamma$	Medición de la expresión proteica por medio de Western blot	Tejido adiposo	Cuantitativa continua	Unidades arbitrarias
AKT	Medición de la expresión proteica por medio de Western blot	Hígado y tejido adiposo	Cuantitativa continua	Unidades arbitrarias
AKT-P	Medición de la expresión proteica por medio de Western blot	Hígado y tejido adiposo	Cuantitativa continua	Unidades arbitrarias
IRS-1	Medición de la expresión proteica por medio de Western blot	Hígado y tejido adiposo	Cuantitativa continua	Unidades arbitrarias
IRS1-P	Medición de la expresión proteica por medio de Western blot	Hígado y tejido adiposo	Cuantitativa continua	Unidades arbitrarias
IRS-2	Medición de la expresión proteica por medio de Western blot	Hígado y tejido adiposo	Cuantitativa continua	Unidades arbitrarias
IRS2-P	Medición de la	Hígado y	Cuantitativa	Unidades

	expresión proteica por medio de Western blot	tejido adiposo	continua	arbitrarias
AMPK	Medición de la expresión proteica por medio de Western blot	Hígado	Cuantitativa continua	Unidades arbitrarias
GFAP	Medición de la expresión proteica por medio de Western blot	Cerebro	Cuantitativa continua	Unidades arbitrarias
Insulina	Cuantificación por RIA	Suero	Cuantitativa continua	ng/mL
Densidad total de espinas dendríticas	Técnicas inmunohistoquímicas	Cerebro	Cuantitativa continua	Unidades arbitrarias
Morfología de espinas dendríticas	Técnicas inmunohistoquímicas	Cerebro	Cuantitativa continua	Unidades arbitrarias

**Manejo de confidencialidad**

**(0) Comentarios**

Acciones, estrategias y precauciones que serán tomadas para proteger la confidencialidad de la información de los pacientes.: No aplica

**Ponderación general de riesgos contra beneficios del estudio propuesto**

**(0) Comentarios**

**Ponderación general de riesgos contra beneficios del estudio propuesto:**

RIESGOS MOLESTIAS GENERADAS : Ninguna  
 COMPLICACIONES DE PROCEDIMIENTO : Ninguno  
 EFECTOS ADVERSOS : Ninguno  
 EFECTOS PSICOLOGICOS : Ninguno  
 METODOS DE SEGURIDAD : Observación diaria de los modelos animales para determinar si existe alguna alteración de la salud, además del control del peso y consumo de alimento.  
 PROCEDIMIENTOS : Consulta con el médico veterinario.  
 OTRO TIPO DE RIESGO : Ninguno

**Riesgo (s) del estudio**

**(0) Comentarios**

Molestias generadas por el estudio: ninguno

**Complicaciones del procedimiento:** ninguno

**Efectos adversos reportados de medicamentos o sustancias utilizadas:** ninguno

**Métodos de seguridad para el diagnóstico oportuno y prevención de los riesgos:** Observación diaria de los modelos animales para determinar si existe alguna alteración de la salud, además del control del peso y consumo de alimento

**Procedimientos a seguir para resolver los riesgos en caso de que se presenten:** Consulta con el médico veterinario.

**Otro tipo de riesgo:** ninguno

#### Consentimiento informado

##### (0) Comentarios

**Hoja de informe al paciente:** Documento1.docx

**Carta de consentimiento informado:** Documento1.docx

#### Declaración de los investigadores

##### (0) Comentarios

**Archivo CEI 04 Declaración de investigadores:** Documento1.docx

1444

### 1. Título del proyecto

Efecto de un portafolio dietario (semilla de chíá, nopal deshidratado, aislado de proteína de soya, y raíz turmérica longa) en un modelo de obesidad inducido por dieta en ratas Wistar macho y el impacto en la función cognitiva y la composición de la microbiota intestinal.

### 2. Investigadores

#### 2a. Identificación

Investigador	Posición institucional	Posición en el Proyecto	Tel. (ext)	Correo-E
Nimbe Torres y Torres	Investigadora en Ciencias Médicas F	Investigadora responsable	2802	[Redacted]
Claudia Pérez Cruz	Jefe de departamento	Investigadora Asociada	57473800 ext 5442	cperezc@cinvestav.mx
Armando Roberto Tovar Palacio	Jefe de Departamento Fisiología de la Nutrición	Investigador asociado	2802	[Redacted]
Mónica Todd Curie Sánchez Tapia		Estudiante de maestría	2802	[Redacted]
Syeda Tauqeerunnisa		Estudiante de doctorado	2802	[Redacted]

#### 2b. Pertinencia del grupo de investigadores con respecto del proyecto

La Dra Nimbe Torres y el Dr Armando Tovar tienen 33 años de experiencia en el área de nutrición, pertenecen al SNI nivel 3 especialistas en nutrigenómica y nutrigenética, la Dra Claudia Pérez tiene 7 años de experiencia en neurodegeneración y de neuroplasticidad en enfermedades crónicas degenerativas y es SNI 1. La QFB Mónica Sánchez tiene experiencia en el modelo de obesidad inducida por dieta y la estudiante de doctorado estará enfocada a la parte de neurociencias.

### 2. Instituciones participantes

- Departamento de Fisiología de la Nutrición, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán
- Departamento de Farmacología, Laboratorio de Neuroplasticidad y Neurodegeneración, CINVESTAV

### 3. Patrocinio

Se llevará a cabo el proyecto con presupuesto departamental y se someterá a CONACYT para su posible financiamiento



#### 4a. Organismos patrocinadores

#### 4b. Especificar si los investigadores reciben pago (monetario o en especie) por su participación específica en la investigación.

Los investigadores no reciben ningun pago pos la participación

### 5. Marco teórico

#### ANTECEDENTES:

##### A. Alimentos funcionales

El termino de Alimento Funcional fue propuesto por primera vez en Japón en la década de los 80's y se refiere a aquellos alimentos en forma natural o procesada que además de sus componentes nutritivos contiene componentes adicionales (compuestos bioactivos) que favorecen a la salud, la capacidad física y el estado mental de quien lo consume ayudando también a la prevención, reducción y tratamiento de enfermedades (Chasquibol S.N. *et. al*, 2003). Los compuestos bioactivos son constituyentes presentes en alimentos en pequeñas cantidades y han sido estudiados para evaluar sus efectos sobre la salud. Estos compuestos han sido agrupados por su variación en estructura química y función. Dentro de estos compuestos se encuentran: polifenoles, flavonoides, fitoestrogenos, carotenos, compuestos organosulfurados, esteroles,  $\beta$ -glucanos, isotiocianatos, monoterpénos, vitaminas, fibra dietética, oligosacáridos; prebióticos, tocoferoles, entre otros. (Pratt DE, 1992)

##### B. Obesidad y deterioro cognitivo

La obesidad y el síndrome metabólico (SM) representan un factor de riesgo para el desarrollo de demencias e incluso de la enfermedad de Alzheimer ( K. Yaffe , 2005; 2007; R. Roberts, 2010; Y. Katsumata, 2012 y V. Solfrizzi, 2011). En modelos animales de obesidad inducida por dieta se ha podido demostrar que la obesidad causa deterioro cognitivo principalmente en tareas dependientes del hipocampo (Davidson, 2013). Estudios preliminares en nuestro laboratorio han demostrado que ratas con obesidad inducida por una dieta alta en grasa saturada y azucar en el agua tienen un deterioro en la memoria a corto plazo que indicaría un daño en la memoria espacial dependiente del hipocampo y que la adición de alimentos como el nopal que contiene polifenoles, vitamina C y beta carotenos disminuye el deterioro cognitivo leve.

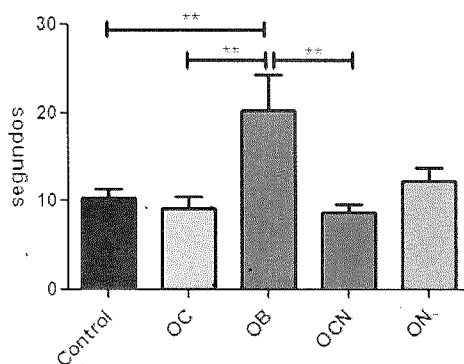


Figura 1 Tiempo que tardan las ratas en reconocer un lugar previamente explorado. Ratas control, OC; ratas con obesidad y alimentadas con la dieta control, OB; ratas obesas, OCN; ratas obesas alimentadas con dieta control + nopal y ON; ratas obesas alimentadas con nopal.

Se ha reportado que el síndrome metabólico incrementa el riesgo de desarrollar enfermedad de Alzheimer (EA) (Davidson T.L. et al, 2013; Farr S.A. et al, 2008; Katsumata Y et al, 2012; Roberts R et al.2010 y Solfrizzi V et al, 2011) e impedimento cognitivo leve (ICL) en varios grupos étnicos (Boitard et al, 2012). Sin embargo, los mecanismos por lo que el SM desencadena un deterioro cognitivo aún son desconocidos. La presente propuesta pretende determinar como las alteraciones metabólicas asociadas al SM ocasionan daño cognitivo en ratas, así como evaluar el efecto neuroprotector de alimentos funcionales para evitar la neurodegeneración.

Recientemente se ha logrado demostrar que el ICL es una condición patológica con un alto grado de progresión hacia la enfermedad de Alzheimer (EA). El ICL podría predecir la aparición de la EA en menos de 10 años y se puede diferenciar claramente de los cambios ocurridos durante una vejez normal (Freeman LR y Sambamurti K, 2009; Stranahan et al AM, 2008).

Los modelos animales de obesidad inducida por dieta generan no solo cambios metabólicos en el perfil de lípidos y niveles de glucosa en sangre, sino también estrés oxidativo, cambios en la microbiota, inflamación y daño a nivel central que conllevan a deterioro cognitivo. Por lo tanto, los modelos animales de obesidad y SM representan un estado de ICL o un estadio temprano de demencia (Kanoski S, Davidson T, 2010).

Existen algunos datos importantes que ayudan a entender la asociación entre el SM u obesidad y el desarrollo de la EA. Lee y colaboradores han mostrado que el tejido adiposo sobre-expresa la proteína precursora beta-amiloide (APP) y secreta la proteína beta amiloidea ( $\beta$ a) al flujo sanguíneo (Benton D, 2008), ambas proteínas relacionadas con la patogénesis de la EA. Más aún, pacientes con SM presentan un incremento de agentes pro-inflamatorios (TNF-alfa, citocinas) quienes actúan en diferentes órganos incluyendo el cerebro, causando neuroinflamación. La EA se caracteriza por un grado severo de neuroinflamación ocasionando neurodegeneración y esta última a su vez, mayor neuroinflamación (Yaffe et al 2004). Por otra parte, el consumo de dietas altas en grasa saturada y azúcares que inducen obesidad, han mostrado daño cognitivo tanto en estudios clínicos como en modelos animales. Se ha observado que animales sujetos al consumo de una dieta alta en grasa saturada y azúcares presentan daño en la barrera hematoencefálica, menos neurogénesis, disminución de contactos sinápticos y de BDNF, así como alteraciones en los niveles de glutamato y su neurotransmisión en

hipocampo, además de incrementos en la activación de microglia y macrófagos en cerebro (Pancani T. et al, 2013)

Por otra parte, modelos animales de obesidad inducida por dieta demuestran que la resistencia a la insulina juega un papel muy importante en la integridad y funciones cognitivas dependientes del hipocampo (Stranahan et al AM, 2008). Estos datos corroboran que el deterioro cognitivo inducido por una dieta alta en grasa saturada tiene un origen multifactorial y resalta la importancia de estudiar los diversos componentes en conjunto.

### C. Obesidad, deterioro cognitivo y Alimentos funcionales

Previos estudios en nuestro laboratorio han demostrado el efecto beneficioso de diferentes tipos de alimentos. Por lo cual hemos diseñado un conjunto de alimentos funcionales que pudieran retrasar o disminuir los diferentes parámetros involucrados en el daño cognitivo y que podrían ofrecer una alternativa terapéutica para prevenir o disminuir el deterioro cognitivo inducido por dietas altas en grasas. La proteína de soya se utilizará por ser una proteína de origen vegetal de buena calidad con una calificación química de 1, que evita los picos posprandiales de glucosa e insulina en ratones (Arellano Martinez, 2014), ratas y en pacientes con diabetes tipo 2 (López R, 2014) y su efecto en la disminución de lípidos. También se utilizará nopal deshidratado debido a la presencia de polifenoles, vitamina C y beta carotenos con actividad antioxidante, a la presencia de fibra soluble e insoluble y a la presencia de polisacáridos complejos como pectina y mucilagos que pueden servir como prebióticos. Estudios preeliminares en nuestro laboratorio han demostrado un aumento en *Akkermansia* después del consumo de nopal, que se ha visto relacionado con el consumo de prebióticos (Amandine E, 2013). Se ha reportado que cambios en la microbiota pueden modificar la expresión de genes en regiones clave del cerebro. También se utilizará aceite de chía rico en ácidos grasos omega 3 que se ha demostrado que pueden proteger del daño cognitivo y de la demencia (Sydenham E, 2006) Se utilizará la cúrcuma ya que mejora la memoria espacial y disminuye el daño oxidativo debido a sus propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y neuroprotectoras.

### D. El papel de la microbiota en la obesidad y deterioro cognitivo

El tubo digestivo alberga un ecosistema bacteriano complejo cercano a los 100 trillones ( $10^{14}$ ) de microorganismos que forman la microbiota intestinal. Esta microbiota intestinal ha evolucionado junto con el ser humano, adaptándose y conviviendo con él en una estrecha relación simbiótica (Backhed F, 2004). La microbiota ejerce funciones nutricionales, metabólicas y protectoras que la vuelven indispensable para el huésped mientras que el huésped le proporciona nutrimentos y condiciones adecuadas para su crecimiento (Bäckhed F. 2007). La presencia de la microbiota intestinal, de hecho, impacta fuertemente en la expresión de genes en la mucosa intestinal del huésped, por ejemplo puede inducir la expresión de genes implicados tanto en la defensa del organismo y la regulación de la función intestinal de barrera como en la vascularización del epitelio y la digestión/absorción de nutrientes.

El incremento de la prevalencia de obesidad y enfermedades crónico-degenerativas asociadas a la misma durante las últimas décadas es alarmante y no puede ser atribuido únicamente a factores genéticos. La investigación está señalando actualmente a la microbiota intestinal como factor ambiental que afecta a la obesidad, ya que la microbiota intestinal contribuye al metabolismo energético y al desarrollo de obesidad en el hospedero (Cani PD, 2009).

Los procesos biológicos del envejecimiento pueden implicar un papel de la microbiota intestinal. Aspectos fisiológicos relacionados con la homeostasis inmunitaria y el balance energético están profundamente influenciados por la microbiota. La disregulación del sistema inmune caracteriza la vejez y constituye un mecanismo patógeno importante que subyace a la fragilidad y las enfermedades crónicas asociadas con la edad. Se ha relacionado con la edad, el cambio en la microbiota intestinal que tiene una contribución a un estado inflamatorio global en los ancianos. Una mejor comprensión de la naturaleza y los factores determinantes de la relación huésped-microbio en la vejez puede traducirse en estrategias que promuevan un envejecimiento saludable y mejorar la calidad de la vida (Rehman T, 2012)

Por otro lado, considerando que la obesidad es uno de los principales factores de riesgo con respecto a la aparición de diabetes de tipo 2, enfermedades vasculares y neurodegenerativas como Alzheimer, varios grupos han especulado con la idea de que la microbiota intestinal podría ejercer un impacto sobre estas y otras enfermedades crónico-degenerativas (Gary SR, 2008). Además, es importante considerar que la resistencia a la insulina es una patología concomitante con la obesidad y se correlaciona con inflamación crónica de baja intensidad (Franklin Tsai, 2009). Basándose en datos experimentales sobre el impacto que ejerce la microbiota intestinal sobre la obesidad, otros autores han propuesto que la microbiota intestinal pudiera contribuir al inicio de la resistencia a la insulina y al estado inflamatorio del hospedero

Finalmente, la mejor comprensión de la composición y funcionamiento de la microbiota intestinal ha permitido el desarrollo de prebióticos y probióticos que pueden ser considerados como herramientas útiles para mantener el equilibrio armonioso de la flora intestinal a través del manejo de la dieta del individuo.

#### **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.**

La obesidad y el síndrome metabólico (SM) representan un factor de riesgo para el desarrollo de demencias e incluso de la enfermedad de Alzheimer, por lo que es necesario conocer diferentes tipos de estrategias dietarias basadas en evidencia científica para disminuir el riesgo de presentar daño cognitivo. El uso de alimentos funcionales con actividad antioxidante podría reducir el daño oxidativo y tener un efecto neuroprotector para evitar la neurodegeneración.

## JUSTIFICACIÓN

El consumo de alimentos funcionales, como lo es el nopal que contiene diferentes tipos de polisacáridos así como su actividad antioxidante podría jugar un papel importante como prebiótico en la modificación de la microbiota intestinal y en la reducción de especies reactivas de oxígeno debido a su actividad antioxidante en un modelo de obesidad inducido por la dieta alta en grasa saturada y azúcar en el agua. La adición de otros alimentos funcionales como la cúrcuma, la proteína de soya y aceite de chía pudieran ejercer un efecto sinérgico que podría retrasar el desarrollo de un daño cognitivo.

Se ha demostrado con estudios previos en el laboratorio que el nopal deshidratado logra disminuir los picos postprandiales de glucosa en sangre en pacientes con DM2, además de demostrar que dicho alimento presenta un índice glucémico e insulémico bajo. Se ha reportado que las pectinas aisladas del nopal provocan una disminución de lípidos y colesterol en sangre de conejillos de indias y el consumo de nopal a largo plazo disminuye los niveles de EROs, lipoperoxidación y la esteatosis hepática. El poder evitar los picos postprandiales de glucosa en la sangre mediante la ingesta de ciertos alimentos, como es el nopal, podría mejorar el desempeño cognitivo ya sea en sujetos obesos o con enfermedades metabólicas, así como en sujetos sanos.

Por otra parte, se sabe que la planta *Salvia hispánica* originaria del continente americano y ampliamente consumido en la era precolombina, contiene gran cantidad de ácidos grasos alfa- $\omega$ -3 y alfa- $\omega$ -6 en un ratio 18:2, lo cual ofrece grandes beneficios para la salud como son disminución de TG y colesterol en plasma. Además contiene diversos flavonoides (miricetina, quercetina, kamperol), y ofrece actividad anti-hipertensiva, anti-inflamatoria, y antidiabética. Hasta el momento, no existen reportes científicos sobre la actividad de la semilla de chía a nivel central, ni su efecto en animales obesos. Por su parte, las isoflavonas presentes en la soya (genisteína y daidzeína) poseen importante actividad anti-apotótica y efectos neuroprotectores en mujeres menopáusicas, además de haber demostrado su acción benéfica en bioquímica sanguínea al restablecer los parámetros asociados al SM. Sin embargo, hasta donde sabemos no existen reportes sobre su acción neuroprotectora. La cúrcuma, derivado de la raíz *curcuma longa*, posee importante actividad anti-inflamatoria, anti-oxidante y anti-proliferativa. La cúrcuma ha mostrado tener importantes efectos benéficos en diversos modelos animales de la EA, al evitar la generación y agregación de  $\beta$ a, inhibiendo la actividad de la acetilcolinesterasa, disminuyendo la inflamación y el estrés oxidativo. Además de sus efectos neuroprotectores, la cúrcuma también ofrece protección anti-hiperglicemia y disminuye la inflamación inducida por la obesidad en modelos animales. Sin embargo, hasta el momento no se ha descrito el efecto neuroprotector de la raíz completa, *turmerica longa*, en modelos de obesidad inducida por dieta.

### 6a. Hipótesis

En el presente protocolo se plantea usar una combinación de distintos alimentos funcionales (semilla de chía, nopal deshidratado, aislado de proteína de soya, y raíz *turmerica longa*) en animales con obesidad inducida por dieta. Debido a la presencia de fibra soluble e insoluble, flavonoides, fitoesteroles, polifenoles,  $\beta$ -carotenos, ácidos grasos omega 3, antioxidantes, proteína vegetal en el portafolio dietario, su consumo tendrá un efecto en la disminución de firmicutes y un incremento en bacterioidetes, además de mostrar una mejora en parámetros

bioquímicos asociados a obesidad, así como un efecto neuroprotector en ratas obesas, debido a la disminución del estrés oxidativo en el cerebro.

## 6b. Objetivos.

### Principal

Determinar el efecto del portafolio dietario sobre la función cognitiva y la composición de la microbiota intestinal en un modelo animal de obesidad inducido por dieta

### Específicos

1. Estudiar el efecto del portafolio dietario sobre la ganancia de peso y la ingesta de alimento en un modelo animal de obesidad inducido por dieta (OID)
2. Determinar la concentración de glucosa, triglicéridos, colesterol total, colesterol LDL, leptina e insulina en ratas con obesidad-inducida por dieta y el efecto del portafolio dietario en los mismos
3. Evaluar el gasto calórico y el cociente respiratorio en ratas con OID que consuman el portafolio dietario
4. Determinar la curva de tolerancia a la glucosa en animales con OID, previa y posteriormente al tratamiento con un portafolio dietario
5. Identificar las principales phylas de microorganismos de la microbiota intestinal
6. Determinar la abundancia de mRNA involucrados en la lipogénesis y la oxidación de ácidos grasos así como de SREBP-1, FAS, PPAR- $\alpha$  y CPT-1
7. Analizar histológicamente hígado, intestino, tejido adiposo y cerebro
8. Estudiar la formación de las especies reactivas de oxígeno (ERO) en cerebro de ratas con obesidad inducida por dieta
9. Evaluar la función cognitiva en ratas con OID y el efecto neuroprotector del PD

## 7. Metodología: Diseño general.

A) Se utilizarán 8 grupos con una n=6 por grupo, ent total 48 ratas Wistar. Las dietas se preparan en la planta piloto del departamento de tecnología de alimentos

- ⇒ Tratamiento 1 (Control): Dieta con caseína al 20% de acuerdo a las recomendaciones del AIN-93 (American Institute of Nutrition).

### **Dieta AIN-93 (CONTROL)**

Ingrediente	%
Almidón	39.749
Caseína	20
Maltodextrina	13.2
Sacarosa	10
Aceite de soya	7

Celulosa	5
Mineral mix	3.5
Vitaminas mix	1
L-Cistina	0.3
Colina	0.25
TBHQ	0.0014

⇒ Tratamiento 2 (DAGS+5% S): Dieta alta en grasa saturada + 5% de sacarosa en el agua de bebida

DAGS	
Ingrediente	%
Almidón	23.903
Caseína	24
Maltodextrina	10.267
Sacarosa	7.778
Aceite de soya	7
Celulosa	2.5
Mineral mix	3.5
Vitaminas mix	1
L-Cistina	0.3
Colina	0.25
TBHQ	0.0014
Inulina	2.5
Manteca	17

⇒ Tratamiento 3 (DAGS +5% fructosa): Dieta alta en grasa saturada + 5% de fructosa en el agua de bebida.

⇒ Tratamiento 4 (DAGS+5% S -AIN-93): Dieta alta en grasa saturada + 5% de sacarosa en el agua de bebida, seguida de la dieta con 20% de caseína de acuerdo a las recomendaciones del AIN-93

⇒ Tratamiento 5 (DAGS+5% S+PD): Dieta alta en grasa saturada + 5% de sacarosa en el agua de bebida, seguida de la dieta con 20% de aislado soya de acuerdo a las recomendaciones del AIN-93 con 5% de nopal y 7% de grasa proveniente de la chíá

Portafolio dietario	
Ingrediente	%
Almidón	37.3
Proteína de soya	20

Maltodextrosa	13.2
Sacarosa	10
Aceite de chia	3.8878
Nopal	5
Mineral mix	3.5
Vitaminas mix	1
L-Cistina	0.3
Colina	0.25
TBHQ	0.0014
Cúrcuma	0.0042

- ⇒ Tratamiento 6 (DAGS+5% S +5% de nopal): Dieta alta en grasa saturada + 5% de sacarosa en el agua de bebida+ 5% de nopal
- ⇒ Tratamiento 7 (DAGS+5% F - AIN-93): Dieta alta en grasa saturada + 5% de fructosa en el agua de bebida, seguida de la dieta con 20% de caseína de acuerdo a las recomendaciones del AIN-93
- ⇒ Tratamiento 8 (DAGS+5% F+PD): Dieta alta en grasa saturada + 5% de fructosa en el agua de bebida, seguida de la dieta con 20% de aislado soya de acuerdo a las recomendaciones del AIN-93 con 5% de nopal y 7% de grasa proveniente de la chía

B) Para estudiar el efecto del consumo del portafolio dietario en un modelo animal de OID, se pretende utilizar ratas Wistar macho que se mantendrán a temperatura controlada ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ), bajo ciclos de luz/oscuridad de 12h/12h y 50-55% de humedad.

Las ratas se dividirán en 3 grupos:

- A. El grupo control (n=6) que consumirá la dieta AIN-93
- B. El grupo obeso con una dieta alta en grasa saturada +5% sacarosa en el agua (n=24)
- C. El grupo obeso con una dieta alta en grasa saturada +5% fructosa en el agua (n=18)

Los grupos serán alimentados con estas dietas por un periodo de 7 meses, posteriormente el grupo B se dividirá en 4 grupos y se alimentaran por 3 meses con las siguientes dietas:

1. AIN-93 (caseína al 20%)
2. DAGS+ 5%S (dieta alta en grasa saturada y 5% de azúcar en el agua)
3. DAGS +5%S + 5% nopal (dieta alta en grasa saturada y 5% de azúcar en el agua +5% de nopal)
4. DAGS + 5%S + PD (dieta alta en grasa saturada y 5% de azúcar en el agua + PD)

El grupo C se dividirá en 3 grupos:

1. AIN-93 (caseína al 20%)
2. DAGS +5% F (dieta alta en grasa saturada y 5% de fructosa en el agua)
3. DAGS +5%F + PD (dieta alta en grasa saturada y 5% de fructosa en el agua + PD)



Durante el periodo de inducción de obesidad (7 meses) así como durante el consumo de la dieta posterior a la obesidad por 3 meses, se tendrá un registro del peso corporal de 2 veces por semana, de la ingesta calórica y antes y después del cambio de dieta se realizará una prueba de tolerancia a la glucosa (CTG), después de un ayuno durante la noche (de 6 a 8 h), se administrará sacarosa vía intraperitoneal 2g/kg y tomar muestra sanguínea de la cola del animal a los 15, 30, 45, 60, 90 y 120 minutos posteriores a la administración de la sacarosa. También se hará la determinación del cociente respiratorio y el gasto calórico mediante una calorimetría indirecta, de acuerdo a lo previamente reportado (Chavez Santoscoy, 2014). También se hará la determinación de parámetros bioquímicos séricos (Glucosa, triglicéridos, insulina, colesterol total, LDL y HDL, leptina), mediante una toma de muestra sanguínea del seno ocular bajo anestesia con sevoflurano y una semana después de las pruebas conductuales para evitar interferencia

Para la determinación de la microbiota se tomara una muestra de heces previo y posterior al consumo del portafolio dietario se el DNA de la muestra y se llevara a cabo la amplificación de phylas específicas por medio de qPCR utilizando primers específicos para cada phyla

Días antes de finalizar los regímenes alimenticios todos los grupos experimentales, durante el periodo de luz, se someterán a exámenes de memoria y aprendizaje, como son el laberinto en T y el reconocimiento de objeto novedoso. Para el laberinto en T, se entrenarán a los animales en una fase de muestra donde se colocará al animal en el brazo de inicio y se permitirá que elija uno de los brazos objetivo. La división central deberá de estar en posición. Una vez realizada la elección se confinará al animal durante 30 segundos en el brazo elegido después de lo cual se retirará la puerta del brazo objetivo y se permitirá que el animal entre al brazo de inicio de donde es retirado. Dos minutos después se volverá a colocar al animal en el brazo de inicio, sin la división central, y se permitirá elegir un brazo objetivo. Dos horas después se repiten todos los pasos anteriores. Para el reconocimiento de objeto novedoso (RON) se habituarán los animales al contenedor (68 x 30 x 40 cm) durante un periodo de 30 min. Veinticuatro horas después se volverá a colocar al animal en el contenedor junto con 2 objetos de características similares por 5 min. Una vez transcurrido este tiempo se retirará al animal y los objetos. Treinta minutos después se colocará al animal en el contenedor junto con uno de los objetos utilizados y otro objeto nuevo. Se permitirá que el animal explore durante 5 minutos

Transcurridos los 10 meses, las ratas se irán sacrificando escalonadamente mediante asfixia con CO<sub>2</sub> previo a una punción cardíaca, bajo anestesia (sevoflurano) y se obtendrá el hígado, colon, cerebro y el tejido adiposo visceral (gonadal y retroperitoneal) y subcutáneo localizado en la zona inguinal e intercostal de todos los grupos y las muestras se congelarán en nitrógeno líquido y se almacenarán a -70°C hasta el día de las determinaciones. Se extraerá ARN para estudiar la expresión de los genes involucrados en la lipogénesis así como en la oxidación de ácidos grasos. Adicionalmente, parte de los tejidos (hígado y tejido adiposo) se destinará a estudios histológicos para observar la morfología y la presencia de inflamación y acumulación de grasa. Respecto al cerebro se realizaran análisis histológico e inmunohistoquímico, para determinar marcadores de inflamación, así como número y morfología de las espinas dendríticas y estrés oxidativo

Se tomarán muestras de sangre para posteriormente separar el plasma y cuantificar parámetros bioquímicos como la glucosa, triglicéridos, leptina, colesterol HDL y LDL, mediante pruebas enzimático-colorimétricas y por último se tomarán muestras de heces para la determinación de la microbiota.

C) El tamaño de la muestra será de 6 ratas Wistar por grupo, ya que en estudios previos se ha demostrado que es el número mínimo de animales para poder observar cambios representativos en la expresión de genes

D) Las ratas son machos de peso inicial de 200g aproximadamente.

E) La asignación del tratamiento será de forma aleatorizada.

F) Se tendrán 8 grupos experimentales de tratamiento

## 8. Metodología: Criterios de selección

A) Ratitas machos de la cepa Wistar, de peso entre 180-220 g.

B) Se eliminarán del estudio las ratas que no aumenten de peso o que presenten un bajo peso, en comparación con las ratas que reciban esta dieta.

## 9. Metodología: Desenlaces y variables

Variable	Definición	Muestra	Tipo de variable	Escala de medición
Glucosa	Concentración plasmática de glucosa por ensayo enzimático	Suero	Cuantitativa continua	mg/dl
Triglicéridos	Concentración plasmática de triglicéridos por ensayo enzimático	Suero	Cuantitativa continua	mg/dl
Colesterol HDL	Concentración plasmática de colesterol HDL por ensayo enzimático	Suero	Cuantitativa continua	mg/dl
Colesterol LDL	Concentración plasmática de colesterol LDL por ensayo enzimático	Suero	Cuantitativa continua	mg/dl
SREBP-1	Medición de la expresión génica por RT-PCR	Hígado	Cuantitativa continua	Unidades arbitrarias
FAS	Medición de la expresión génica por RT-PCR	Hígado	Cuantitativa continua	Unidades arbitrarias
ACC	Medición de la	Hígado	Cuantitativa	Unidades

	expresión génica por RT-PCR		continua	arbitrarias
CPT-1	Medición de la expresión génica por RT-PCR	Hígado	Cuantitativa continua	Unidades arbitrarias
PPAR- $\alpha$	Medición de la expresión génica por RT-PCR	Hígado	Cuantitativa continua	Unidades arbitrarias
NOX	Medición de la expresión génica por RT-PCR	Hígado y tejido adiposo	Cuantitativa continua	Unidades arbitrarias
TNF- $\alpha$	Medición de la expresión génica por RT-PCR	Hígado y tejido adiposo	Cuantitativa continua	Unidades arbitrarias
PPAR- $\gamma$	Medición de la expresión génica por RT-PCR	Tejido adiposo	Cuantitativa continua	Unidades arbitrarias
XBP-1	Medición de la expresión génica por RT-PCR	Hígado y tejido adiposo	Cuantitativa continua	Unidades arbitrarias
BIP	Medición de la expresión génica por RT-PCR	Hígado y tejido adiposo	Cuantitativa continua	Unidades arbitrarias
ATF-6	Medición de la expresión génica por RT-PCR	Hígado y tejido adiposo	Cuantitativa continua	Unidades arbitrarias
Leptina	Medición de la expresión génica por RT-PCR	Tejido adiposo	Cuantitativa continua	Unidades arbitrarias
Adiponectina	Medición de la expresión génica por RT-PCR	Tejido adiposo	Cuantitativa continua	Unidades arbitrarias
APP	Medición de la expresión génica por RT-PCR	Tejido adiposo	Cuantitativa continua	Unidades arbitrarias
GFAP	Medición de la expresión génica por RT-PCR	Cerebro	Cuantitativa continua	Unidades arbitrarias
SREBP-1	Medición de la expresión proteica por medio de Western blot	Hígado	Cuantitativa continua	Unidades arbitrarias
FAS	Medición de la expresión proteica por medio de Western blot	Hígado	Cuantitativa continua	Unidades arbitrarias
PPAR- $\alpha$	Medición de la expresión proteica por	Hígado	Cuantitativa continua	Unidades arbitrarias

- A) SE TESTA NOMBRE DE PERSONAS FISICAS QUE NO SE TIENE LA CERTEZA DE SER SERVIDORES PÚBLICOS TODA VEZ QUE SE TRATA DE DATOS PERSONALES DE ACUERDO AL ARTÍCULO 113 FRACCIÓN I DE LA L.F.T.I.P.**
- B) SE TESTA FIRMA DE PERSONAS FISICAS QUE NO SE TIENE LA CERTEZA DE SER SERVIDORES PÚBLICOS TODA VEZ QUE SE TRATA DE DATOS PERSONALES DE ACUERDO AL ARTÍCULO 113 FRACCIÓN I DE LA L.F.T.I.P.**
- C) SE TESTA CORREO ELECTRÓNICO DE PERSONAS FISICAS QUE NO SE TIENE LA CERTEZA DE SER SERVIDORES PÚBLICOS TODA VEZ QUE SE TRATA DE DATOS PERSONALES DE ACUERDO AL ARTÍCULO 113 FRACCIÓN I DE LA L.F.T.I.P.**
- D) SE TESTA NÚMERO TELEFÓNICO DE PERSONAS FISICAS QUE NO SE TIENE LA CERTEZA DE SER SERVIDORES PÚBLICOS TODA VEZ QUE SE TRATA DE DATOS PERSONALES DE ACUERDO AL ARTÍCULO 113 FRACCIÓN I DE LA L.F.T.I.P.**